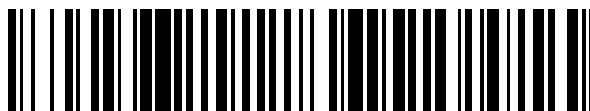


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 660**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2006** **E 06836868 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012** **EP 1945260**

54 Título: **Usos de anticuerpos anti-CD40**

30 Prioridad:

01.11.2005 US 732730 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.04.2013

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (50.0%)
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH y
XOMA TECHNOLOGY LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

AUKERMAN, SHARON LEA y
LUQMAN, MOHAMMAD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 400 660 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

Usos de anticuerpos anti-CD40

- 5 **[0001]** Esta invención se refiere a nuevos usos de los anticuerpos anti-CD40, en particular en el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas que están asociadas con las células expresoras de CD40.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** Muchos miembros de la familia de ligandos del factor de necrosis tumoral (TNF) y sus receptores correspondientes regulan el crecimiento de las células normales por la inducción de la apoptosis o por la mejora de la supervivencia celular y la proliferación. Es este equilibrio entre las señales apoptóticas y de supervivencia y las señales de proliferación la que mantiene la homeostasis celular normal. Al menos 26 receptores de la familia de TNF y 18 ligandos de la familia del TNF se han identificado hasta la fecha. Las formas biológicamente activas de receptores y ligandos son trímeros de proteína auto-ensamblados. Se han identificado formas de membrana y solubles tanto de los receptores como de los ligandos. Aunque los dominios intracelulares de los receptores no comparten homología de secuencia, sus dominios extracelulares comprenden 40 repeticiones de amino-ácidos, ricas en cisteína. Sus colas citoplasmáticas señalan mediante la interacción con dos grupos importantes de las proteínas intracelulares: factores asociados al receptor TNF (TRAF) y dominio de muerte (DD) que contienen proteínas. La interacción entre al menos seis TRAFs y centros de unión TRAF humanos en la cola citoplásmica de algunos de estos receptores inicia varias vías de señalización, incluyendo AKT (la serina/treonina quinasa conocida como proteína quinasa B o PKB), factor nuclear- κ B (NF- κ B), y proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Véase, por ejemplo, la revisión de Younes y Kadin (2003) J. Clin. Oncol. 18:3526-3534.
- 25 **[0003]** El miembro receptor de la familia de TNF CD40 es un antígeno 50-55 kDa de superficie celular presente en la superficie tanto de células B normales y neoplásicas humanas, células dendríticas, monocitos, macrófagos, li células T CD8⁺, células endoteliales, células monocíticas y epiteliales, y muchos tumores sólidos, incluyendo cáncer de pulmón, de mama, de ovario, de vejiga urinaria, y de colon. La unión del ligando CD40 (CD40L) al antígeno CD40 en la membrana de la célula B proporciona una señal coestimuladora positiva que estimula la activación y la proliferación de las células B, lo que resulta en la maduración de células B en una célula plasmática que secreta altos niveles de inmunoglobulina soluble. El CD40 activa TRAF-2,-3,-5, y -6, que sobrerregula diversas vías de señalización tras la unión de CD40 con CD40L (ya sea CD40L unión de membrana o CD40L soluble), incluyendo la quinasa extracelular regulada por señal (ERK), quinasa amino terminal c-jun (JNK), p38 proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), AKT, y NF- κ B (véase, por ejemplo, Younes y Carbone (1999) Int. J. Biol. Markers 14:135-143; van Kooten y Banchereau (2000) J. Leukoc. Biol. 67:2-17).
- 30 **[0004]** Las células B malignas de tipos de tumores de linaje de células B expresan CD40 y parecen depender de la señalización de CD40 para la supervivencia y proliferación. Las células transformadas de pacientes con bajo y alto grado de linfomas de células B, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia de Walsdenstrom y enfermedad de Hodgkin expresan CD40. La expresión de CD40 también se detecta en la leucemia mieloblástica aguda y el 50% de los linfomas relacionados con el SIDA.
- 40 **[0005]** Varios carcinomas y sarcomas también exhiben altos niveles de expresión de CD40, aunque el papel de la señalización de CD40 en estas células cancerosas es menos conocida. El CD40 que expresan los carcinomas incluyen el carcinoma de vejiga urinaria (Paulie. et al. (1989) J. Immunol. 142:590-595; Braesch-Andersen et al. (1989) J. Immunol. 142:562-567), carcinoma de mama (Hirano et al. (1999) Blood 93:2999-3007; Wingett y col. (1998) Breast Cancer Res. Treat. 50:27-36); cáncer de próstata (Rokhlin et al. (1997) Cáncer Res. 57:1758-1768), Carcinoma de células renales (Kluth et al. (1997) Cancer Res. 57:891-899), carcinoma indiferenciado nasofaríngeo (UNPC) (Agathangelou et al. (1995) Am. J. Pathol. 147:1152-1160), Carcinoma de células escamosas (SCC) (Amo et al. (2000) Eur. J. Dermatol. 10:438-442; Posner et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:2261-2270), carcinoma papilar de tiroides (Smith et al. (1999) 9:749-755 tiroides), melanoma maligno cutáneo (van den Oord et al. (1996) Am. J. Pathol. 149:1953-1961), carcinoma gástrico (Yamaguchi et al. (2003) Int. J. Oncol. 23 (6) :1697-702), y carcinoma de hígado (ver, por ejemplo, Sugimoto et al. (1999) Hepatología 30 (4) :920-26, Discutiendo el carcinoma hepatocelular humano). Para sarcomas que expresan CD40, véase, por ejemplo, Lollini et al. (1998) Clin. Cancer Res. 4 (8) :1843-849, discutiendo el osteosarcoma humano y el sarcoma de Ewing.
- 55 **[0006]** La señalización de CD40 protege las células B inmaduras y los linfomas de células B de la apoptosis inducida por Fas o IgM (véase, por ejemplo, Wang et al. (1995) J. Immunol. 155:3722-3725). Las células del linfoma de células de manto expresan un alto nivel de CD40, y la adición del ligando exógena CD40 ha demostrado mejorar su supervivencia y el rescate de la apoptosis inducida por fludarabina (Clodi et al. (1998) Brit. J. Haematol. 103:217-219). El papel de la señalización de CD40 en la supervivencia y proliferación de células B malignas hace que el antígeno CD40 sea una diana potencial para la terapia contra el cáncer. De hecho, los antagonistas de los anticuerpos anti-CD40 inhiben la proliferación y/o diferenciación de células B humanas malignas *in vitro* (Véase, por ejemplo, Solicitud de Publicación de Patente U.S. Nº. 20040109857). Otros modelos murinos de linfomas humanos agresivos han demostrado la eficacia *in vivo* de los anticuerpos anti-CD40 en el aumento de la supervivencia animal.
- 60
- 65

Véase, por ejemplo, Funakoshi et al. (1994) Blood 83:2787-2794; Tutt et al. (1998) J. Immunol. 161:3176-3185; y Szocinski et al. (2002) Blood 100: 217-223.

[0007] El ligando CD40 (CD40L), también conocido como CD154, es una proteína de transmembrana 32-33 kDa que también existe en dos formas solubles biológicamente activas más pequeñas, 18 kDa y 31 kDa, respectivamente (Graf et al. (1995) Eur. J. Immunol. 25:1749-1754; Mazzei et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:7025-7028; Pietravalle et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:5965-5967). CD40L se expresa en Células T CD4⁺ auxiliares activadas, pero no en reposo (Lane et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2573-2578; Spriggs et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1543-1550; y Roy et al. (1993) J. Immunol. 151:1-14). Tanto CD40 como CD40L se han clonado y caracterizado (Stamenkovi et al. (1989) EMBO J. 8:1403-1410; Armitage et al. (1992) Nature 357:80-82; Lederman et al. (1992) J. Exp. Med. 175:1091-1101; y Hollenbaugh et al. (1992) EMBO J. 11:4313-4321). Véase también Patente U.S. N°. 5.945.513. Describiendo el CD40L humano. Las células transfectadas con el gen CD40L y expresando la proteína CD40L en su superficie pueden activar la proliferación de células B y, junto con señales estimuladoras, pueden inducir la producción de anticuerpos (Armitage et al. (1992) *supra*; y Patente U.S. N°. 5.945.513). Los pacientes con cánceres linfoides, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, y trombocitemia esencial presentan elevados niveles séricos de CD40L soluble (sCD40L) que no se ven en los pacientes sanos. La expresión constitutiva de CD40L se ha observado en un subgrupo de pacientes con varios cánceres linfoides de células B, incluyendo el linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), linfoma folicular (FL), y el linfoma de células B infectadas por VIH. Véase, por ejemplo, Clodi et al. (1998) Br. J. Haematol. 103:270-275; Schattner et al. (1998) Blood 91:2689-2697; Moses et al. (1997) Nat. Med. 3:1242-1249; Trentin et al. (1997) Cancer Res. 57:4940-4947; Y Pham et al. (2002) Inmunidad 16:37-50). CD40L puede jugar un papel importante en la interacción dependiente del contacto de células B expresoras de tumor CD40 dentro de los folículos neoplásicos o células de Reed-Sternberg expresoras de CD40 las en áreas de la enfermedad de Hodgkin (Carbone et al. (1995) Am. J. Pathol. 147:912-922). Sin embargo, el mecanismo de señalización CD40 mediado por CD40L que conduce a la supervivencia en comparación con las respuestas de muerte celular de las células B malignas no se conoce completamente. Por ejemplo, en células de linfoma folicular, la baja regulación de la molécula de TRAIL que induce la apoptosis (Apo-2L) (Ribeiro et al. (1998) British J. Haematol. 103:684-689) y la sobreexpresión de bcl-2, y en el caso de B-CLL, la baja regulación de CD95 (Fas/Apo-1) (Laytragoon-Lewin et al. (1998) Eur. J. Haematol. 61:266-271) se han propuesto como mecanismos de supervivencia. En contraste, las pruebas en el linfoma folicular indican que la activación de CD40 conduce a la sobre regulación de TNF (Worm et al. (1994) Internacional Immunol. 6:1883-1890) y moléculas CD95 (Plumas et al. (1998) Blood 91:2875-2885).

[0008] Los anticuerpos monoclonales humanos anti-CD40 y varios usos de los mismos se describen en las solicitudes de patente en copropiedad publicadas como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294. Esas solicitudes describen específicamente un anticuerpo humano monoclonal IgG₁ anti-CD40, denominado CHIR-12.12 en las mismas, que se generó por inmunización de ratones transgénicos portadores del locus de la cadena pesada humana IgG₁ y del locus de cadena ligera humana κ (XenoMouse[®] technology; Abgenix, California).

[0009] Como se muestra por análisis FACS, CHIR-12.12 se une específicamente al CD40 humano y pueden prevenir la unión del ligando CD40 (CD40L). CHIR-12.12 puede competir con CD40L pre-unida a la superficie celular CD40. El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 es un antagonista fuerte e inhibe la proliferación *in vitro* mediada por CD40L de las células B normales y malignas. El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 inhibe directamente la supervivencia y las vías de señalización mediadas por CD40L en linfocitos B humanos normales. *In vitro*, CHIR-12.12 mata las células primarias de cáncer de pacientes con NHL por ADCC. La actividad anti-tumoral dependiente de la dosis se observó en un modelo de xenoinjerto de linfoma humano. CHIR-12.12 se encuentra actualmente en ensayos de fase I para tumores malignos de células-B.

[0010] CD20 es un antígeno de la superficie celular expresada en fase temprana en la diferenciación de células B y permanece en la superficie celular durante todo el desarrollo de las células B. CD20 está implicado en la activación de las células B, se expresa a niveles muy altos en células B neoplásicas, y es un objetivo terapéutico clínicamente reconocido (véase, por ejemplo, Hooijberg et al. (1995) Investigación del Cáncer 55: 2627). Los anticuerpos dirigidos a CD20, tal como rituximab (Rituxan[®]), han sido aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. para el tratamiento del linfoma no-Hodgkin (véase, por ejemplo, Boye et al. (2003) Ann. Oncol. 14:520). Rituxan[®] ha demostrado ser un tratamiento eficaz para un grado bajo, intermedio, y alto del linfoma no-Hodgkin (LNH) y activo en otras malignidades de células B (véase, 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, Coiffer 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, o Vose et al. (1999) Ann. Oncol. 10:58 a).

[0011] Aunque el mecanismo exacto de acción no se conoce, las pruebas indican que los efectos anti-linfoma de Rituxan[®] son, en parte, debidos a la citotoxicidad mediada por complemento (CMC), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), la inhibición de la proliferación celular, y, finalmente, la inducción directa de la apoptosis. ADCC es un mecanismo principal de acción para muchos anticuerpos monoclonales

comercializados y en investigación. Algunos pacientes, sin embargo, se hacen resistentes al tratamiento con Rituxan® (véase Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20:3262, Grillo-López et al. (1998) J. Clin. Oncol. 16:2825, o Jazirehi et al. (2003) Mol. Cancer Ther. 2:1183-1193). Por ejemplo, algunos pacientes pierden 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, de un 30% a un 50% de los pacientes con LNH de bajo grado no presentan respuesta clínica a este anticuerpo monoclonal (Hainsworth et al. (2000) Blood 95:3052-3056; Colombat et al. (2001) Blood 97:101-106). La actividad clínica de rituximab en LNH también se ha demostrado que está correlacionada con el genotipo FcγRIIIa del paciente. Los pacientes con el polimorfismo FcγRIIIa 158aa de V/V o V/F son más sensibles a rituximab que aquellos con F/F (por ejemplo, véase Cartron et al. (2002) Blood 99 (3) :754-758o Dall'Ozzo et al. Cancer Res. (2004) 64:4664-4669). En 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, son necesarias formas alternativas de intervención terapéutica.

[0012] Por ello, hay una necesidad continua de nuevos agentes terapéuticos y nuevas estrategias terapéuticas para cánceres y condiciones premalignas. De manera particular, existe la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes que son homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa-158F y son refractarios al tratamiento con anticuerpos anti-CD20, como rituximab (Rituxan®). Además, un anticuerpo que puede matar las células malignas sin necesidad de un combinado dará lugar a un medicamento que es más barato de fabricar y puede tener menos efectos secundarios.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] Se proporcionan métodos para el tratamiento de un paciente humano en un cáncer o condición premaligna que está asociada con las células que expresan CD40, donde el paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F). Los métodos incluyen administrar al paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. La invención también proporciona el uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 en un paciente humano heterocigoto o homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F).

[0014] También se proporcionan métodos de inhibición de producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigotos u homocigotos para FcγRIIIa-158F (genotipo V / F o F / F), que incluye la administración al paciente humano de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40. La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (V/F o F/F).

[0015] También se facilitan métodos y kits para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que se puede tratar con un anticuerpo anti-CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®). En algunas realizaciones, los métodos incluyen: a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado a las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), y b) la determinación del anticuerpo monoclonal humano, o que tiene un linfoma de células B que es resistente a la terapia inicial con este anticuerpo, necesitando formas alternativas de intervención terapéutica.

[0016] Por ello, hay una necesidad continua de nuevos agentes terapéuticos y nuevas estrategias terapéuticas para cánceres y condiciones premalignas. De manera particular, existe la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes que son homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa-158F y son refractarios al tratamiento con anticuerpos anti-CD20, como rituximab (Rituxan®). Además, un anticuerpo que puede matar las células malignas sin necesidad de un combinado dará lugar a un medicamento que es más barato de fabricar y puede tener menos efectos secundarios

RESUMEN DE LA INVENCION

[0017] La invención proporciona un anticuerpo anti-CD40 para el uso en el tratamiento de un cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan tanto CD40 como CD20 en un paciente humano refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®) en el que dicho paciente humano padece cáncer o una condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 identificado mediante un método que incluye:

- a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado a las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (VN, V/F o F/F) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;

en el que dicho cáncer o condición premaligna se puede tratar con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/ F o F/F).

[0018] La invención también proporciona un método para identificar un paciente humano con un cáncer o condición premaligna que se puede tratar con un anticuerpo anti-CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que incluye:

- 5 a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado a las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (VN, V/F o F/F) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;

10 en el que dicho cáncer o condición premaligna se puede tratar con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/ F o F/F).

[0019] La invención también proporciona un método para seleccionar una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que incluye:

- 15 a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado a las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- 20 b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (VN, V/F o F/F) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;

en el que, si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para el tratamiento de dicho cáncer o condición premaligna.

25 BREVE RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

[0020] Se describen los métodos para el tratamiento de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40, donde el paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F). Los métodos incluyen administrar al paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. También se describe en el presente documento el uso de una cantidad profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 en pacientes humanos heterocigotos u homocigotos para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F).

[0021] También se describen métodos de inhibición de producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), que incluye administrar al paciente humano una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40. También se describe el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (V/F o F/F).

[0022] También se describen los métodos y kits para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que se puede tratar con un anticuerpo anti-CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®). En algunas realizaciones, los métodos incluyen: a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), y b) determinar el genotipo FcγRIIIa-158 del paciente humano (V/V, V/ F o F/F); en el que el cáncer o condición premaligna malignas es tratable con un anticuerpo humano anti-CD40 si el paciente es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F). Los métodos pueden incluir además la etapa de administración a un paciente humano identificado utilizando este método de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. Los kits de la divulgación para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que es tratable con un anticuerpo anti-CD40 incluyen reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano.

[0023] También se describen en el presente documento los métodos y kits para la selección de una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®). En algunas realizaciones, los métodos incluyen: a) la identificación de un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna que está asociado con células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), y b) determinar el genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano (V/V, V/F o F/F); en el que si el paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F / F), un anticuerpo anti-CD40 se selecciona para el tratamiento del cáncer o condición premaligna. Los métodos pueden incluir además la etapa de administración a un paciente humano identificado utilizando este método de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. Los kits de divulgación para la selección de una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna asociado con células que expresan CD40 incluyen reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano.

[0024] También se describen en el presente documento métodos para el tratamiento de un paciente humano para cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40, en donde los métodos incluyen administrar al paciente un anticuerpo humano de lenta internalización. En una de esas realizaciones, se administra una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 al paciente humano de tal modo que el anticuerpo anti-CD40 no se ve significativamente internalizado por las células que expresan CD40 después de su administración. En otro modo de realización, se administra una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 al paciente humano de tal modo que el anticuerpo anti-CD40 permanece de manera sustancial e uniformemente distribuido sobre la superficie de las células que expresan CD40 después de su administración. En otro modo de realización adicional, se administra un anticuerpo anti-CD40 al paciente humano de tal manera que una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 está presente en la superficie de las células que expresan CD40 en el paciente humano después de su administración.

[0025] Los anticuerpos anti-CD40 para uso de acuerdo con la presente invención se unen específicamente al antígeno CD40. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 para uso en los métodos de la divulgación en anticuerpos monoclonales particulares, exhiben una fuerte afinidad de unión para los FcγRIIIa-158V humanos, una fuerte afinidad de unión para los FcγRIIIa-158F humanos, o una fuerte afinidad de unión para ambos FcγRIIIa-158V y FcγRIIIa-158F humanos. En algunas de estas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 se pueden unir a cualquiera de los dos aminoácidos alotipos FcγRIIIa 158 (V o F) sobre las células asesinas naturales de un paciente humano (NK) con características de unión que son adecuadas para causar una potentes citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos adecuados anti-CD40 incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos anti-CD40 que están libres de actividad agonista significativa, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos anti-CD40 que son antagonistas de señalización CD40-CD40L en células que expresan CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se selecciona del grupo que consiste en: a) el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12; b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; c) un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5, las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5; d) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en ISEQ ID NO: 1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, y las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3; e) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12; f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-87 de la secuencia de CD40 humana mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9; g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que comprende los residuos 82-89 de la secuencia de CD40 humana mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9; h) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva; i) el anticuerpo monoclonal del apartado anterior a) o un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores c)-h), donde el anticuerpo se produce de manera recombinante, y j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los apartados precedentes a)-i), en el que el fragmento retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno humano CD40.

[0026] Los métodos descritos en el presente documento encuentran uso en el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas que están asociados a las células que expresan CD40. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a, los cánceres de linaje de células B, tumores malignos de células no-B hematológicas, por ejemplo, leucemia mielocítica aguda, tumores sólidos, y cánceres o condiciones premalignas asociados con las células que expresan CD20. Los métodos descritos aquí son particularmente ventajosos con respecto a los tipos de cáncer y condiciones premalignas que están asociados con células que expresan tanto CD40 como CD20. De esta manera, la divulgación permite el tratamiento de pacientes que tienen cáncer o condición premaligna que es refractaria al tratamiento con otros agentes oncoterapéuticos, incluyendo anticuerpos anti-CD20 para los pacientes que son homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa-158F (genotipo V/V o F/F).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0027]

La figura 1A-1F muestra resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en seis líneas celulares.
La figura 2A-2D muestra resultados de un análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en células CLL del paciente (n = 8).
La figura 3 resume los resultados de un análisis de ADCC en células CLL de pacientes (n = 9).
La figura 4 muestra los resultados de un análisis de ADCC en células CLL de pacientes, utilizando células NK efectoras de dos donantes diferentes.
La figura 5 muestra los resultados de la cuantificación de expresión en superficie celular de CD40 y CD20 en células CLL de pacientes y células B normales.
La figura 6 resume la actividad de ADCC para las células con expresión en la superficie celular de CD40 y CD20 cuantificada.

La figura 7 es un gráfico de barras que muestra los niveles de unión superficie celular de CHIR-12.12 en líneas celulares Daudi y ARH77.

La figura 8 muestra los resultados de investigación de la internalización de CHIR-12.12 y rituximab en las células CLL del paciente por análisis FACS.

La figura 9 muestra los resultados de investigación de la internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células B normales por microscopía confocal de anticuerpos marcados FITC.

La figura 10 muestra los resultados de la investigación de la internalización de CHIR-12.12 y rituximab en pacientes con células CLL por microscopía confocal de anticuerpos marcados Alexa488.

La figura 11 resume la relación entre la actividad ADCC y la internalización.

La figura 12 es un diagrama de barras que muestra el porcentaje máximo de lisis específica de células Daudi con CHIR-12.12 o rituximab por células NK efectoras purificadas procedentes de donantes con genotipos FcγRIIIa diferentes.

La figura 13 es un diagrama de barras que muestra la potencia ADCC (ED₅₀) de CHIR-12.12 o rituximab en células Daudi por células NK efectoras purificadas de donantes con genotipos FcγRIIIa diferentes.

La figura 14 resume la ADCC comparativa de CHIR-12.12 y rituximab contra células CLL de pacientes (n = 9) por parte de células NK humanas a partir de múltiples donantes humanos genotipados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0028] Los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, son capaces de mediar la potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células diana que expresan CD40 en condiciones donde otros anticuerpos que mediadores de ADCC son menos eficaces o relativamente ineficaces. Contrariamente a otros anticuerpos, como el rituximab (Rituxan®), los anticuerpos anti-CD40 utilizados según la invención pueden unirse a cualquiera de los dos aminoácidos alotipos FcγRIIIa158 (V o F) en las células asesinas naturales de un paciente humano (NK) con características de unión que son adecuadas para provocar un potente ADCC. Este hallazgo es inesperado y representa un avance en nuestra capacidad para tratar cánceres y condiciones premalignas a través de diversos pacientes.

[0029] Por consiguiente, anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas asociados con las células que expresan CD40 en pacientes humanos homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), además de los pacientes humanos homocigotos para FcγRIIIa-158V (genotipo V/V).

[0030] Se describe aquí un método para tratar a un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), incluyendo el método la administración a dicho paciente humano de la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40. También se describe el uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F).

[0031] Como se señaló anteriormente, la actividad clínica de rituximab en NHL se ha demostrado que está correlacionada con el genotipo FcγRIIIa del paciente. Los pacientes con el polimorfismo FcγRIIIa 158aa de F/F son menos sensibles a rituximab que aquellos con V/V o V/F (por ejemplo, véase Cartron et al. (2002) Blood 99 (3): 754-758o Dall'Ozzo et al. (2004) Cancer Res. 64:4664-4669). Por consiguiente, la divulgación es especialmente ventajosa para el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas que no son sensibles al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, tales como rituximab (Rituxan®).

[0032] Los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, se pueden utilizar en métodos para inhibir la producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), además de los pacientes humanos homocigotos para FcγRIIIa-158V (genotipo V / V).

[0033] Se describe aquí un método para inhibir la producción de anticuerpos por parte de las células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), lo que incluye administrar a dicho paciente humano una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 como puede ser CHIR-12.12. También se describe el uso de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para inhibir la producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (V/F o F/F).

[0034] No se habría esperado por una persona experta en la técnica que se podría inhibir la producción de anticuerpos por parte de células B en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F).

[0035] La presente descripción permite el régimen de tratamiento seleccionado para un paciente humano individual que se basa en el genotipo FcγRIIIa-158 del paciente mediante la administración de un anticuerpo anti-CD40 mediador de ADCC.

[0036] Se describe aquí un método para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que incluye:

- a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);

en el que dicho cáncer o enfermedad pre-maligna es tratable con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F). Los métodos pueden incluir además la etapa de administración a un paciente humano identificado utilizando este método de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

[0037] Este método de identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 que se puede realizar fácilmente por parte de una persona experta en la técnica, usando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe incluir reactivos adecuados para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano. El presente documento también describe un kit para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40, que incluye los reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano. Se describen los kits adecuados con más detalle en otra parte del presente documento.

[0038] También se describe en el presente documento un método para seleccionar una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene un cáncer o condición premaligna que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que incluye:

- a) identificar un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
- b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);

donde, si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para el tratamiento de dicho cáncer o condición premaligna. De manera particular, se puede seleccionar un anticuerpo anti-CD40 con preferencia al tratamiento con rituximab (Rituxan®). Los métodos pueden incluir además la etapa de administración a un paciente humano identificado utilizando este método de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

[0039] Este método de selección de una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene un cáncer o condición premaligna se puede realizar fácilmente por una persona experta en la técnica, usando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe incluir reactivos adecuados para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano. El presente documento también describe un kit para la selección de una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene un cáncer o condición premaligna asociado con las células que expresan CD40, que incluye los reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano.

[0040] Los inventores también han hecho el sorprendente descubrimiento de que los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, no se ven significativamente internalizados por las células que expresan CD40 después de la administración. En su lugar, los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, se distribuyen de manera sustancialmente uniforme sobre la superficie de las células que expresan CD40 por un periodo significativo de tiempo tras la administración. Esto está en contraste con otros anticuerpos, especialmente anticuerpos anti-CD20, como rituximab (Rituxan®).

[0041] La duración de la unión de CD40 en la superficie de las células que expresan CD40 y la distribución uniforme del anticuerpo anti-CD40 en la superficie de las células que expresan CD40 permite a los anticuerpos anti-CD40 para mediar la potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células diana que expresan CD40, a través de la unión a un FcR, como FcγRIIIa en células asesinas naturales (NK).

[0042] Se describe aquí un método para tratar a un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40, el método incluye administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40, de tal manera que el anticuerpo anti-CD40 no se ve significativamente internalizado por las células que expresan CD40 después de la administración.

[0043] El presente documento también describe un método para tratar a un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado a las células que expresan CD40, el método incluye administrar a dicho paciente humano una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40, como puede ser el anticuerpo anti-CD40 que permanece de forma sustancial y uniformemente distribuido sobre la superficie de las células que expresan CD40 después de la administración

[0044] El presente documento también describe un método para tratar a un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40, el método incluye administrar a dicho paciente humano un anticuerpo anti-CD40, tal cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 está presente en la superficie de las células que expresan CD40 en dicho paciente humano tras la administración.

[0045] Estos aspectos de la invención implican, por lo tanto, administrar a un paciente un anticuerpo de lenta internalización. Por "anticuerpo de lenta internalización" se entiende un anticuerpo que queda dispuesto sobre la superficie de la célula durante un período de tiempo importante. Como el experto en la materia sabrá, esta propiedad contrasta con las propiedades que se estiman ventajosas para muchas aplicaciones terapéuticas que realmente requieren internalización del complejo anticuerpo-receptor para que la terapia sea eficaz. En este contexto, un periodo significativo de tiempo excede generalmente las 3 horas, preferiblemente 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 168 horas o más.

[0046] Preferiblemente, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90 %, o más del anticuerpo inicialmente dispuesto en la superficie de una célula que expresa CD40 queda dispuesto sobre la superficie de la célula después del período de tiempo significativo mencionado anteriormente.

[0047] La internalización de anticuerpos se puede evaluar mediante varios ensayos. Por ejemplo, las líneas celulares tales como la línea celular del linfoma de Daudi, o la línea celular ARH77 MM, se pueden utilizar para evaluar el efecto de la unión de un anticuerpo candidato en la internalización. Las células se incuban con el IgG1 humano (anticuerpo de control) o el anticuerpo candidato en hielo (con azida de sodio al 0,1% para bloquear la internalización) o a 37 °C (sin azida de sodio) por un período de tiempo de 3 horas adecuadamente. Después de un lavado con tampón de tinción frío (por ejemplo, PBS 1% BSA 0,1% de azida de sodio), las células se tiñen, por ejemplo con IgG-FITC de cabra anti-humano durante 30 minutos en hielo. El grado de tinción se puede evaluar; en este ejemplo, la media geométrica de intensidad de fluorescencia (MFI) se pudo grabar, como mediante FACS Calibur. Otros ensayos adecuados serán conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo <http://www.abgenix.com/documents/SBS2003%20poster.pdf>).

[0048] En los experimentos expuestos en los Ejemplos 4 y 5 en este documento, no observó diferencia en IMF se entre las células incubadas con CH12.12 en hielo en presencia de azida de sodio o a 37 °C en la ausencia de azida de sodio (véanse las Figuras 7-10). Estos datos muestran que CH12.12, tras la unión a CD40 no se internaliza y se sigue visualizando en la superficie celular durante más tiempo que rituximab.

[0049] Un resumen de técnicas y procedimientos estándar que pueden emplearse con el fin de utilizar la invención se detalla a continuación. Se entenderá que esta invención no se limita a la metodología, protocolos, líneas celulares, vectores y reactivos descritos. También se debe entender que la terminología utilizada aquí es con el propósito de describir realizaciones particulares y no se pretende que esta terminología se debe limitar el alcance de la presente invención. El alcance de la invención está limitado solamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas.

[0050] Las abreviaturas estándar para los nucleótidos y los aminoácidos se utilizan en esta especificación.

[0051] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de los que trabajan esta técnica.

[0052] Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Ejemplos de textos particularmente adecuados para consulta incluyen los siguientes: Sambrook et al. (1989) Clonación Molecular, Un Manual de Laboratorio (2d ed.); DN Glover, ed. (1985) Clonación de ADN, Volúmenes I y II; MJ Gait, ed. (1984) Síntesis Oligonucleotida; BD Hames y Higgins SJ, eds. (1984) Hibridación de Ácido Nucleico; BD Hames y Higgins SJ, eds. (1984) Transcripción y Traducción; RI. Freshney, ed. (1986) Cultura Celular Animal; células inmovilizadas y enzimas (IRL Press, 1986); B. Perbal (1984) Guía práctica para la clonación molecular; Métodos en series de Enzimología (Academic Press, Inc.), especialmente los volúmenes 154 y 155; JH Miller y Calos MP, eds. (1987) Vectores de Transferencia Génica para Células Mamarias (Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer y Walker, eds. (1987) Métodos inmunológicos en Biología Celular y Molecular (Academic Press, Londa); Scopes (1987) Purificación de proteínas: Principios y Práctica (2ª ed.; Springer Verlag, Nueva York.); y DM Weir y CC Blackwell, eds. (1986) Manual de Inmunología Experimental, Volúmenes I-IV.

[0053] Los métodos de la invención implican el uso de anticuerpos anti-CD40 en el tratamiento de cánceres condiciones y premalignas asociadas a las células que expresan CD40.

[0054] Por "CD40", "antígeno CD40", o "receptor de CD40" se entiende la glicoproteína transmembránica 50-55 kDa de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (véase, por ejemplo, Patente U.S. N°. 5.674.492 y

4.708.871; Stamenkovic et al. (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Antígenos de Tejido 36:33; Barclay et al. (1997) El Libro de Hechos del Antígeno Leucocitario (2^a ed.; Academic Press, San Diego)). Dos isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcripción empalmadas alternativamente de este gen, se han identificado. La primera isoforma (también conocida como "isoforma larga" o "isoforma 1") se expresa como un precursor polipéptido del aminoácido 277 (SEQ ID NO: 9; primero reportada como GenBank N° de acceso CAA43045, e identificada como isoforma 1 en GenBank No. de acceso NP_001241), codificado por la SEQ ID NO: 8 (véase GenBank números de acceso X60592 y NM_001250), que tiene una secuencia de señal representada por los primeros 19 residuos. La segunda isoforma (también conocida como "isoformas corta" o "isoforma 2") se expresa como un polipéptido precursor del aminoácido 203 (SEQ ID NO: 7; GenBank N° de acceso NP_690593), codificado por la SEQ ID NO: 6 (N° de Acceso del GenBank NM_152854), que también tiene una secuencia de señal representada por los primeros 19 residuos. Los polipéptidos precursores de estas dos isoformas de CD40 humano comparten en común sus primeros 165 residuos (es decir, los residuos 1-165 de la SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9). El polipéptido precursor de la isoforma corta (mostrado en la SEQ ID NO: 7) está codificado por una variante de transcripción (SEQ ID NO: 6) que carece de un segmento de codificación, lo que conduce a un cambio del marco de traducción; la isoforma de CD40 resultante contiene una terminal C más corta y distinta (residuos 166-203 de la SEQ ID NO: 7) de la que figura en la isoforma larga de CD40 (terminal C mostrada en los residuos 166-277 de la SEQ ID NO: 9). Para los fines de la presente invención, el término "CD40", "antígeno CD40", "antígeno CD40 de superficie celular", o "receptor de CD40" abarca tanto las isoformas cortas como largas de CD40. El antígeno CD40 puede estar total o parcialmente glicosilado.

[0055] Como se señaló en otra parte de este documento, CD40 se encuentra en la superficie tanto de las células B normales como neoplásicas humanas, células dendríticas, monocitos, macrófagos, Células T CD8⁺, células endoteliales, células monocíticas y epiteliales, y muchos tumores sólidos, incluyendo cáncer de pulmón, de mama, de ovario, de vejiga urinaria y de colon. Las células B malignas de tipos de tumores de linaje de células B expresan CD40 y parecen depender de la señalización de CD40 para la supervivencia y proliferación. Las células transformadas de pacientes con bajo y alto grado de linfomas de células B, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, macroglobulinemia de Walsdenstrom, y enfermedad de Hodgkin expresan CD40. La expresión de CD40 también se detecta en la leucemia mieloblástica aguda y el 50% de los linfomas relacionados con el SIDA. Varios carcinomas y sarcomas también exhiben altos niveles de expresión de CD40, aunque el papel de la señalización de CD40 en relación con la expresión de CD40 en estas células cancerosas es menos conocido. Los carcinomas que expresan CD40 incluyen carcinoma de vejiga urinaria, carcinoma de mama, cáncer de próstata, carcinoma de células renales, carcinoma indiferenciado nasofaríngeo (UNPC), carcinoma de células escamosas (SCC), carcinoma papilar de tiroides, melanoma maligno de la piel, carcinoma gástrico, y carcinoma de hígado.

[0056] Por "células que expresan CD40" se entiende a las células normales o malignas que expresan niveles detectables del antígeno CD40. Preferiblemente, las células que expresan CD40 son células que expresan niveles detectables de antígeno de superficie celular CD40. Los métodos para detectar la expresión de CD40 en células son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, técnicas de PCR, inmunohistoquímica, citometría de flujo, transferencia Western, ELISA, y similares. Estos métodos permiten la detección de ARNm de CD40, antígeno CD40 y antígeno de superficie celular CD40. La detección de expresión de CD40 en la superficie celular puede realizarse como se describe en el Ejemplo 3 en el presente documento, o por medio de otros métodos adecuados.

[0057] La célula maligna puede ser una célula B maligna. Por "célula B maligna" se entiende cualquier célula B neoplásica, incluyendo, pero sin limitarse a, células B derivadas de linfomas incluyendo linfomas de células B de grado bajo, intermedio, y alto, linfomas inmunoblásticos, linfomas no-Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, Virus Epstein-Barr (EBV) linfomas inducidos y l linfomas relacionados con el SIDA, así como leucemias agudas linfoblásticas de células B, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, y similares.

[0058] Por "ligando de CD40" o "CD40L" se entiende principalmente a la proteína de membrana 32-33 kDa que también existe en dos formas solubles más pequeñas biológicamente activas, 18 kDa y 31 kDa, respectivamente (Graf et al. (1995) Eur. J. Immuno/. 25:1749-1754; Mazzei et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:7025-7028; Pietravalle et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:5965-5967). El CD40L humano es también conocido como CD154 o gp39. Por "ligando de CD40" o "CD40L" se entiende también a cualquier otro péptido, polipéptido o proteína que puede unirse a y activar una o más vías de señalización de CD40. Así, los "ligandos de CD40" incluyen, pero no se limitan a, proteínas ligando CD40 de larga duración y variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad suficiente para llevar a cabo la función de unión a una señalización CD40 estimulante en las células que expresan CD40. Las modificaciones a un ligando nativo CD40, por ejemplo, CD40L humano, incluyen, pero no se limitan a, sustituciones, delecciones, truncamientos, extensiones, proteínas de fusión, fragmentos, miméticos de péptidos, y similares.

[0059] Por "señalización de CD40" se entiende cualquiera de las actividades biológicas que resultan de la interacción de la superficie celular CD40 con un ligando de CD40 u otro agonista, como puede ser un anticuerpo agonista. Ejemplos de señalización de CD40 son señales que conducen a la proliferación y supervivencia de las células que expresan CD40, y la estimulación de una o más vías de señalización de CD40 en las células que expresan CD40. Se entiende por "vía de señalización" o "vía de transducción de señal" CD40 al menos una reacción bioquímica, o un grupo de reacciones bioquímicas, que resulta de la interacción del receptor de CD40 con un ligando

de CD40, por ejemplo, CD40L, y que genera una señal que, cuando se transmite a través de la vía de señalización, lleva a la activación de una o más moléculas de aguas abajo en la cascada de señalización. Las vías de transducción de señales implican un número de moléculas de transducción de señales que conducen a la transmisión de una señal desde el receptor de superficie celular CD40 a través de la membrana plasmática de una célula, y a través de una o más de una serie de moléculas de transducción de señales, a través del citoplasma de la célula, y en algunos casos, en el núcleo de la célula. De particular interés para la presente invención son las vías de transducción de señales CD40, incluyendo la vía de señalización AKT, que conduce a la activación de AKT, y en última instancia, la activación de NF- κ B a través de la vía de señalización NF- κ B, y las vías de señalización de las proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), incluyendo la vía de señalización MEK/ERK y la vía de señalización MEK/p38, que conducen a la activación de ERK y p38, respectivamente.

[0060] Como se señaló anteriormente, se describe aquí un método para tratar a un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para Fc γ R11a-158F (genotipo V/F o F/F), incluyendo el método la administración a dicho paciente humano de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

[0061] Por "paciente humano" se entiende un paciente humano que padece, tiene riesgo de desarrollar o recae en, cualquier cáncer o condición premaligna que está asociada a las células que expresan CD40.

[0062] Por cáncer o condición pre-maligna asociada a las células que expresan CD40 se entiende cualquiera de los cánceres de linaje de células B, tumores malignos hematológicos de células no-B y tumores sólidos que son conocidos por estar asociados con las células que expresan CD40.

[0063] Los métodos descritos aquí son útiles en el tratamiento terapéutico de cánceres de linaje de células B. Los cánceres de linaje de células B que están asociados con las células que expresan CD40 incluyen, pero no están limitados a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), la leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, y los linfomas, incluyendo, pero sin limitarse a, linfoma linfocítico pequeño difuso, folicular, DLBCL, linfoma de tejido linfóide asociado a la mucosa, linfoma monocitoides de células B, linfoma esplénico, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma inmunoblástico, linfoma relacionado con el SIDA, y similares.

[0064] Por lo tanto, los métodos aquí descritos encuentran uso en el tratamiento de sujetos que tienen linfomas no-Hodgkin relacionados con la proliferación o acumulación anormal e incontrolable de células B. Para los fines de la presente invención, tales linfomas se mencionarán de acuerdo con el esquema de clasificación de la *Formulación de Trabajo*, es decir, aquellos linfomas de células B categorizados como de grado bajo, grado intermedio y grado alto (ver "El Proyecto de Clasificación Patológica del Linfoma no-Hodgkin," Cancer 49 (1982) :2112-2135). Por lo tanto, los linfomas de células B de bajo grado incluyen células pequeñas foliculares linfocíticas con pequeñas hendiduras, y linfomas foliculares mixtos de células con pequeñas hendiduras y grandes; linfomas de grado intermedio incluyen células grandes foliculares, células difusas con pequeñas hendiduras, células mixtas pequeñas y grandes difusas, y linfomas de células grandes difusas, y los linfomas de alto grado incluyen linfomas de células grandes inmunoblásticas, y linfomas de células pequeñas no hendidas de tipo Burkitt y no-Burkitt.

[0065] Los métodos descritos en este documento son útiles en el tratamiento terapéutico de linfomas de células B que se clasifican según el sistema de Clasificación Revisada Europea y Americana de Linfomas (REAL). Estos linfomas de células B incluyen, pero no se limitan a, linfomas clasificados como neoplasias de células B precursoras, tales como leucemia/linfoma linfoblástica de células B; neoplasmas de células B periféricas, incluyendo leucemia linfocítica crónica/linfoma linfocítico pequeño de células B, linfoma/inmunocitoma linfoplasmocitoide, linfoma de manto de células (MCL), linfoma de folículo central (folicular) (incluidos los difusos de células pequeñas, difusos de células pequeñas y grandes mixtas, y linfomas difusos de células grandes), el linfoma de células B de la zona marginal (incluyendo nodal, extranodal, y tipos esplénicos), plasmacitoma/mieloma, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de células del subtipo mediastínico primario (tímico), linfoma de Burkitt, y linfoma de células B similar al de Burkitt de alto grado, y linfomas inclasificables de grado bajo o grado alto de células B.

[0066] Los métodos descritos aquí son útiles en el tratamiento terapéutico de la condición premaligna conocida como GMSI (gammapatía monoclonal de significado indeterminado). Aproximadamente el 25% de los pacientes con GMSI eventualmente desarrollan mieloma múltiple (MM) o un trastorno relacionado con células plasmáticas (Kyle (1993), Mayo Clinic. Proc. 68:26-36). La proliferación de células plasmáticas malignas en la médula ósea, la detección de una proteína de suero o la orina monoclonal (proteína M), anemia, hipercalcemia, insuficiencia renal, y lesiones óseas líticas son manifestaciones clínicas de MM, mientras que GMSI es reconocida clínicamente como la presencia de proteína M en el suero o en la orina sin otras características clínicas de MM (ver, por ejemplo, Kyle y Lust (1989) Semin. Hematol. 26:176-200; Greipp y Lust Células Madre (1995) 13:10-21). Los pacientes GMSI son asintomáticos y tienen medidas estables de la proteína M (Kyle (1993), Mayo Clinic. Proc. 68:26-36). Una vez que se identifica GMSI en un sujeto, la terapia de mantenimiento con un apropiado anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, un antagonista de anticuerpo anti-CD40, puede bloquear el desarrollo de la mieloma múltiple en estos pacientes.

[0067] Los métodos descritos en este documento también son útiles para el tratamiento terapéutico de células B no relacionados con tumores malignos hematológicos asociados con células que expresan CD40, tales como las leucemia mielocítica aguda y similares.

[0068] Los métodos descritos en este documento también son útiles para el tratamiento terapéutico de los tumores sólidos. Los tumores sólidos que están asociados a las células que expresan CD40 incluyen, pero no se limitan a, cánceres de ovario, de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de pulmón de células pequeñas), de mama, de colon, de riñón (incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales), de vejiga, de hígado (incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, de próstata, nasofaríngeo, de tiroides (por ejemplo, carcinoma papilar de tiroides), y cánceres de piel tales como melanoma, y sarcomas, incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing.

[0069] El cáncer o condición premaligna asociado con las células que expresan CD40 puede ser un cáncer o condición premaligna asociado con un nivel no deseable de señalización de CD40 en las células que expresan CD40, o el cáncer o condición premaligna podría estar sólo indirectamente asociado con las células que expresan CD40. Por "cáncer o condición premaligna asociado con un nivel no deseable de señalización de CD40" se entiende un cáncer o condición premaligna cuyo desarrollo o progresión se asocia con un nivel no deseable de señalización de CD40.

[0070] Por "un nivel no deseable de señalización de CD40" se entiende cualquier nivel fisiológicamente indeseable de señalización de CD40 que se pueda producir en las células que expresan CD40 en un paciente humano que tiene un cáncer o condición premaligna.

[0071] El cáncer o enfermedad premaligna puede ser un cáncer o condición premaligna asociado con las células que expresan CD20. Tales cánceres o condiciones premalignas incluyen, pero no están limitados a, los tumores malignos de células B mencionados en otra parte de este documento.

[0072] La divulgación es particularmente ventajosa respecto a los cánceres y condiciones premalignas que están asociados con células que expresan tanto CD40 como CD20, debido a que los nuevos usos de los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12 descritos en este documento, tratan los problemas asociados con el uso de anti-CD20, tales como Rituxan®. De manera particular, la divulgación permite el tratamiento de pacientes que tienen cáncer o condición premaligna que es refractario al tratamiento con otros agentes oncoterapéuticos, incluyendo anticuerpos anti-CD20, tales como Rituxan® para los pacientes que son homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), como se describe con más detalle en otra parte del presente documento.

[0073] En los métodos terapéuticos de la divulgación, al menos un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte en este documento se utiliza para desarrollar una respuesta terapéutica positiva con respecto a un cáncer o condición premaligna.

[0074] Por "respuesta terapéutica positiva" con respecto a un cáncer o condición premaligna se entiende una mejora en el cáncer o condición premaligna en asociación con la actividad terapéutica del anticuerpo anti-CD40, y/o una mejora en los síntomas asociados con el cáncer o condición premaligna. Es decir, se puede observar un efecto anti-proliferativo, la prevención de nuevos crecimientos 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 asociados con las células que expresan CD40. Así, por ejemplo, una respuesta terapéutica positiva se refiere a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el tamaño del tumor, (2) una reducción en el número de células cancerosas (es decir, neoplásicas); (3) un aumento en la muerte celular neoplásica, (4) inhibición de la supervivencia de las células neoplásicas, (4) inhibición (es decir, ralentizar en cierta medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral, (5) inhibición (es decir, ralentizar en cierta medida, preferentemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; (6) inhibición (es decir, ralentizar en cierta medida, preferentemente detención) de la metástasis tumoral, (7) la prevención de nuevos crecimientos tumorales; (8) una tasa de aumento de la supervivencia del paciente, y (9) alguna medida de alivio de uno o más síntomas asociados con el cáncer.

[0075] Se pueden determinar respuestas terapéuticas positivas en cualquier malignidad dada por criterios estandarizados de respuesta específica de dicho tumor maligno. La respuesta del tumor puede evaluarse para cambios en la morfología del tumor (es decir, la carga tumoral global, tamaño del tumor y similares) utilizando técnicas de detección tales como resonancia magnética (MRI), formación de imágenes radiográficas x, tomografía computarizada (TC), imagen escaneada del hueso, endoscopia y muestreo de la biopsia del tumor, incluida la aspiración de médula ósea (BMA) y el recuento de células tumorales en la circulación. Además de estas respuestas terapéuticas positivas, el sujeto sometido a terapia con el agente terapéutico anti-CD40 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 los llamados síntomas B, es decir, sudores nocturnos, fiebre, pérdida de peso y/o urticaria. Para condiciones premalignas, la terapia con un agente terapéutico anti-CD40 puede bloquear

y/o prolongar el tiempo antes de que se desarrolle una condición maligna relacionada, por ejemplo, el desarrollo de mieloma múltiple en sujetos que sufren de la gammopatía monoclonal de significado incierto (MGUS).

[0076] Una mejora en la enfermedad puede estar caracterizada por una respuesta completa. Por "respuesta completa" se entiende la ausencia de enfermedad clínicamente detectable con normalización de cualquier estudio radiográfico previamente anormal de médula ósea y líquido cefalorraquídeo (LCR) o de proteína monoclonal anormal en el caso de mieloma. Tal respuesta debe persistir durante al menos 4 a 8 semanas, o en enfermedades específicas, a veces de 6 a 8 semanas, después del tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención. Como alternativa, una mejora en la enfermedad puede clasificarse como una respuesta parcial. Por "respuesta parcial" se entiende al menos aproximadamente una disminución del 50% en toda la carga medible del tumor (es decir, el número de células malignas presentes en el sujeto, la mayor medida de las masas tumorales o la cantidad de proteína monoclonal anormal) en ausencia de nuevas lesiones y que persiste de 4 a 8 semanas según sea necesario. En el mieloma, la respuesta normal (25-50% de disminución de la proteína monoclonal en la orina) también se considera una respuesta. Tal respuesta es aplicable solamente a los tumores mensurables.

[0077] Por "dosis terapéuticamente o profilácticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz" se entiende una cantidad de anticuerpo anti-CD40 que, cuando se administra, produce una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con un cáncer o condición premaligna asociada a las células que expresan CD40. Las dosificaciones adecuadas se describen con más detalle en otra parte del presente documento. El método de tratamiento puede incluir una administración única de una dosis terapéuticamente eficaz o múltiples administraciones de una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, como se describe en más detalle en otra parte de este documento.

[0078] "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. "Neoplásico," como se usa aquí, se refiere a cualquier forma de crecimiento celular desregulado o no regulado, ya sea maligno o benigno, resultando en un crecimiento anormal de tejido. Así, "las células neoplásicas" incluyen las células malignas y benignas con el crecimiento celular desregulado o no regulado.

[0079] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, el linfoma, la leucemia y los tumores sólidos. Por "células B relacionadas con el cáncer" o "cáncer del linaje de células B" se entiende cualquier tipo de cáncer en el que el crecimiento celular desregulado o no regulado está asociado a las células B.

[0080] "Tratamiento" se define aquí como la aplicación o administración de un anticuerpo anti-CD40 a un paciente, o la aplicación o administración de un anticuerpo anti-CD40 a un tejido aislado o línea celular de un paciente, en el que paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, y donde el propósito es curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. Por "tratamiento" también se entiende la aplicación o administración de un compuesto farmacéutico que incluye el anticuerpo anti-CD40 a un paciente, o la aplicación o administración de un compuesto farmacéutico que incluye el anticuerpo anti-CD40 a un tejido aislado o línea celular de un paciente que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, donde el propósito es curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.

[0081] Por "actividad anti-tumoral" se entiende una reducción en la tasa de proliferación o acumulación de células malignas que expresan CD40, y por lo tanto una disminución de la tasa de crecimiento de un tumor existente o en un tumor que surge durante la terapia y/o la destrucción de las actuales células neoplásicas (tumor) o células neoplásicas recién formadas, y por lo tanto una disminución en el tamaño global de un tumor durante la terapia. La terapia con al menos un anticuerpo anti-CD40 provoca una respuesta fisiológica que es beneficiosa con respecto al tratamiento de estados de la enfermedad asociados con la estimulación de la señalización de CD40 en las células que expresan CD40 en un ser humano.

[0082] Los métodos descritos aquí son particularmente útiles para el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas, incluidos los enumerados anteriormente, que son refractarios a los tratamientos oncoterapéuticos de primera línea. El término "oncoterapéutico" se entiende como cualquier tratamiento para el cáncer, como quimioterapia, cirugía, radioterapia, terapia contra el cáncer con anticuerpos, y combinaciones de los mismos. Ejemplos de tratamientos oncoterapéuticos se describen con más detalle en otra parte en la presente memoria. Por "refractario" se entiende el cáncer en particular que es resistente a, o que no responde a la terapia con un agente oncoterapéutico particular. Un cáncer puede ser refractario a la terapia con un agente terapéutico particular, ya sea desde el inicio del tratamiento con el agente terapéutico particular (es decir, no responde a la exposición inicial al agente terapéutico), o como resultado del desarrollo de resistencia al agente terapéutico, ya sea en el transcurso de un primer periodo de tratamiento con el agente terapéutico o durante un periodo de tratamiento posterior con el agente terapéutico. Por lo tanto, la presente descripción es útil para el tratamiento de un paciente humano que es

refractario al tratamiento con un agente anti-cáncer, cuando ese paciente humano o es resistente al tratamiento o no responde a la terapia con el agente anti-cáncer.

[0083] Los métodos descritos en este documento implican el uso de anticuerpos anti-CD40. "Anticuerpos" son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H). Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuros varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también regularmente puentes espaciados intracatenarios de disulfuro. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo, el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Los residuos de aminoácidos particulares se cree que forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y pesada. El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en secuencia entre los anticuerpos. Las regiones variables confieren especificidad de unión al antígeno. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la unión del receptor Fc (FcR), la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo, la iniciación de la citotoxicidad dependiente de complemento, y la degranulación de mastocitos.

[0084] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0085] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas "pesadas", las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, 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 diferentes funciones efectoras. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 humanos tienen actividad ADCC (citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células). Los anticuerpos IgG1, en particular los anticuerpos IgG1 humanos, son particularmente útiles en los métodos descritos en la presente memoria.

[0086] "Las células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más $FcRs$ y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos $Fc\gamma RIII$ y llevan a cabo la función efectora de citotoxicidad dependiente de antígeno mediada por células (ADCC). Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos, eosinófilos y neutrófilos, con PBMCs y células NK como preferentes. Los anticuerpos que tienen actividad ADCC son típicamente del isotipo IgG1 o IgG3. No se ha de señalar que además de aislar anticuerpos IgG1 e IgG3, tales anticuerpos que median ADCC se pueden hacer mediante diseño de una región variable de un anticuerpo no-ADCC o un fragmento de región variable de una región de isotipo IgG1 o IgG3 constante.

[0087] Los términos "receptor Fc" o " FcR " se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de la $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RII$, y subclases $Fc\gamma RIII$, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores $Fc\gamma RII$ incluyen $Fc\gamma RIIA$ (un "receptor de activación") y $Fc\gamma RIIB$ (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de las mismas. El receptor de activación $Fc\gamma RIIA$ contiene un motivo de activación de inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición $Fc\gamma RIIB$ contiene un motivo de inhibición de inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase Daeron (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:203-234). $FcRs$ se revisan en Ravetch y Kinet (1991) Annu Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel et al. (1994) Inmunométodos 4:25-34, y de Haas et al. (1995) J. Lab. Clin. Med 126:330-341. Otros $FcRs$, incluyendo aquellos que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término " FcR " en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, $FcRn$, que es responsable de la transferencia de IgGs maternos al feto (Guyer et al. (1976) J. Immunol, 117:587 y Kim et al. (1994) J. Immunol. 24:249 (1994)).

[0088] El término "anticuerpo" se usa aquí en el sentido más amplio y cubre anticuerpos completamente montados, fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 (Por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, Fv, y otros fragmentos), anticuerpos de cadena única, diacuerpos, quimeras de anticuerpos, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos humanizados y similares), y péptidos recombinantes que incluyen a los anteriores. El término "anticuerpo" abarca tanto a los anticuerpos policlonales como a los monoclonales.

[0089] Como se usa en este documento, "anticuerpo anti-CD40" abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD40. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 para uso en los métodos aquí descritos, especialmente, los anticuerpos monoclonales anti-CD40, exhiben una fuerte afinidad de un solo centro de unión para el antígeno CD40. Tales anticuerpos monoclonales muestran una afinidad por CD40 (K_D) de al menos 10^{-5} M, al menos 3×10^{-5} M, preferiblemente al menos 10^{-6} M, o al menos 10^{-7} M, más preferiblemente al menos 10^{-8} M, o al menos 10^{-12} M, cuando se miden usando un ensayo convencional tal como Biacore™. El análisis Biacore se conoce en la técnica y se proporcionan detalles en el "Manual de BIAaplicaciones". Los métodos descritos en WO 01/27160 se pueden utilizar para modular la afinidad de unión.

[0090] Por "reconoce específicamente" o "se une específicamente a" se entiende que el anticuerpo anti-CD40 no se une a antígenos no relacionados, tales como el antígeno CD20.

[0091] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 para uso en los métodos descritos en este documento, especialmente anticuerpos monoclonales, exhiben una fuerte afinidad de unión para los FcγRIIIa-158V humanos. Preferiblemente, un anticuerpo anti-CD40 para uso en los métodos de la invención se une a un FcγRIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 0,5 μM cuando se mide usando un ensayo convencional tal como Biacore™. Como se describe en el Ejemplo 6 en la presente memoria, el anticuerpo CHIR-12.12 se une al FcγRIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de 492 nM.

[0092] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 para uso en los métodos descritos en la presente memoria para anticuerpos monoclonales particulares, presentan una fuerte afinidad de unión para los humanos FcγRIIIa-158F. Preferiblemente, un anticuerpo anti-CD40 para uso en los métodos de la invención se une al FcγRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 12 μM cuando se mide usando un ensayo convencional tal como Biacore™. Preferiblemente, el anticuerpo anti-CD40 para uso en los métodos de la invención se une al FcγRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10 μM, al menos aproximadamente 8 μM, de al menos aproximadamente 6 μM, al menos aproximadamente 5 μM, al menos aproximadamente 4 μM, o al menos aproximadamente 3 μM. Como se describe en el Ejemplo 6 en la presente memoria, el anticuerpo CMR-12.12 se une al FcγRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de 2,8 μM.

[0093] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 para uso en los métodos aquí descritos, especialmente los anticuerpos monoclonales, exhiben una fuerte afinidad de unión para ambos FcγRIIIa-158V humano y FcγRIIIa-158F. Preferiblemente, un anticuerpo anti-CD40 para uso en los métodos de la invención se une al FcγRIIIa-158V humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 0,5 μM y se une al FcγRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 12 μM, cuando se mide usando un ensayo convencional como Biacore™.

[0094] Los anticuerpos para uso en los métodos de la presente invención pueden ser producidos utilizando cualquier método de producción de anticuerpos adecuado conocido por los expertos en la técnica.

[0095] El anticuerpo anti-CD40 usado en los métodos de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal. Por lo tanto, los sueros policlonales pueden prepararse siguiendo métodos convencionales. En general, una solución que contiene el antígeno de interés (en este caso, el antígeno CD40) se usa primero para inmunizar un animal adecuado, preferiblemente un ratón, rata, conejo o cabra. Los conejos o cabras se prefieren para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero obtenible, y la disponibilidad de anticuerpos marcados anti-conejo y anti-cabra.

[0096] Los sueros de los animales inmunizados pueden examinarse para la reactividad del anticuerpo contra el antígeno inicial. Los linfocitos pueden aislarse de nodos linfáticos o células del bazo y además pueden seleccionarse para células B mediante selección para las células CD138-negativas y CD19 positivas. En un aspecto, tales cultivos de células B (BCC) pueden fusionarse a células de mieloma para generar hibridomas como se detalla en este documento.

[0097] Los sueros policlonales se pueden preparar también en un animal transgénico, preferiblemente un ratón que lleva loci de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, las células Sf9 que expresan la proteína de interés (en este caso, el antígeno CD40), se utilizan como inmunógeno. La inmunización también puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la solución que contiene el antígeno en solución salina, preferiblemente en un adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o intramuscular). Una dosis de 50-200 mg/inyección es normalmente suficiente. La inmunización generalmente se impulsa 2-6 semanas más tarde con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, preferiblemente usando adyuvante incompleto de Freund. Alternativamente se pueden generar anticuerpos por inmunización *in vitro* usando métodos conocidos en la técnica, que para los fines de esta invención se consideran equivalentes a la inmunización *in vivo*. Los antisueros policlonales se obtienen por sangrado del animal inmunizado en un recipiente de vidrio o plástico, incubando la sangre a 25 °C durante una hora, seguido por incubación a 4 °C durante 2-18 horas. El suero se recupera por centrifugación (por ejemplo, 1.000 xg durante 10 minutos). Se pueden obtener entre 20 y 50 ml por sangrado a partir de conejos.

[0098] La producción de las células Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) se describe en la Patente U.S. Nº 6.004.552. En el caso de CD40, brevemente, las secuencias que codifican el CD40 humano se recombinaron en un baculovirus usando vectores de transferencia. Los plásmidos se cotransfectaron con ADN de baculovirus de tipo salvaje en células Sf 9. Las células Sf 9 recombinantes infectadas con baculovirus se identificaron y purificaron clonalmente.

[0099] El anticuerpo anti-CD40 usado en los métodos de la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal. El término "anticuerpo monoclonal" (y "mAb") como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en menores cantidades. El término no está limitado con respecto a las especies del anticuerpo y no requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular.

[0100] En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante (epítomo) en el antígeno.

[0101] Por "epítomo" se entiende la parte de una molécula antigénica en que se produce un anticuerpo y a la que se une el anticuerpo. Los epítomos pueden incluir residuos lineales de aminoácidos (es decir, los residuos dentro del epítomo están dispuestos secuencialmente uno después de otro en forma lineal), residuos no lineales de aminoácidos (denominados en este documento como "epítomos no lineales"; estos epítomos no están dispuestos secuencialmente), o tanto residuos lineales como no lineales de aminoácidos. Un anticuerpo monoclonal anti-CD40 adecuado para uso en los métodos de la presente invención será capaz de unirse específicamente a un epítomo del antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, es decir, un epítomo que está expuesto al exterior de la célula.

[0102] Los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención se pueden hacer por el procedimiento del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, O se pueden preparar por métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Patente U.S. Nº 4.816.567). Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554 (1990) Y Patente U.S. Nº 5.514.548. Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628 y Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de afinidad elevada (intervalo nM) de anticuerpos humanos por intercambio de cadenas (Marks et al. (1992) BioTechnology 10:779-783), Así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al. (1993) Nucleic. Acids Res. 21:2265-2266). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0103] En el método tradicional de Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496, un ratón es inmunizado habitualmente con una solución que contiene un antígeno. La inmunización puede llevarse a cabo mezclando o emulsionando la solución que contiene el antígeno en solución salina, preferiblemente en un adyuvante como el adyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral. Cualquier método de inmunización conocido en la técnica puede ser utilizado para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, el bazo (y opcionalmente, varios ganglios linfáticos grandes) se retiran y se disocia en células individuales. Las células del bazo pueden seleccionarse aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de interés. Las células B que expresan inmunoglobulina unida a membrana específicas para el antígeno se unen a la placa y no se enjuagan. 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 se cultivan en un medio selectivo. Las células resultantes se plaquean por dilución en serie y se ensayan para la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). El anticuerpo seleccionado monoclonal (mAb) secretor de hibridomas se cultivan luego ya sea *in vitro* (Por ejemplo, en botellas de cultivo de tejidos o reactores de fibra hueca), o *in vivo* (como ascitis en ratones).

[0104] En otro aspecto, los cultivos de células B pueden seleccionarse además para reactividad frente al antígeno inicial, preferentemente. Tal selección incluye el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) con la proteína diana/antígeno, un ensayo de competición con anticuerpos conocidos que se unen al antígeno de interés, y la unión *in vitro* a células CHO transfectadas de manera transitoria o de otro tipo que expresan el antígeno diana.

[0105] Cuando los anticuerpos anti-CD40 para uso en los métodos de la invención se preparan utilizando métodos de ADN recombinante, el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma descritas en este documento sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN podría colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped

recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen en Skerra et al. (1993) *Curr. Opin. in Immunol.* 5:256 y Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. Alternativamente, el anticuerpo puede producirse en una línea celular tal como una línea celular CHO, como se describe en las Patentes U.S. N° 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. Brevemente, la línea celular se transfecta con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Por la transfección de las dos proteínas en vectores separados, se pueden producir los anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo.

[0106] Una "célula huésped", como se usa aquí, se refiere a un microorganismo o una línea celular eucariota o célula cultivada como una entidad unicelular que puede ser, o ha sido, usada como receptor de un vector recombinante u otros polinucleótidos de transferencia, e incluyen 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 como el progenitor original, debido a la mutación natural, accidental o deliberada.

[0107] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40, tal como CHIR-12.12, puede producirse en células CHO usando el sistema de expresión de genes GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que usa glutamina sintetasa como marcador. Véase también: Patentes U.S. N° 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.

[0108] Los anticuerpos monoclonales para CD40 son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las secciones dedicadas a antígenos de células B en McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III y IV* (Oxford University Press, Nueva York); Patentes U.S. N° 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; WO 00/63395; Las publicaciones internacionales N° 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* 03:08; y Banchereau et al. (1991) *Science* 251:70.

[0109] Como se señaló anteriormente, el término "anticuerpo" tal como se usa aquí abarca a los anticuerpos quiméricos. Por anticuerpos "quiméricos" se entienden los anticuerpos son más preferiblemente derivados usando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que incluyen tanto componentes humanos (incluyendo especies inmunológicamente "relacionadas", por ejemplo, chimpancé) y componentes no humanos. Así, la región constante del anticuerpo quimérico es de la manera más preferible y sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico viene más preferiblemente derivada de una fuente no humana y tiene la especificidad antigénica deseada para el antígeno de interés (CD40). La fuente no humana puede ser cualquier fuente de vertebrado que se pueda utilizar para generar anticuerpos para antígeno CD40. Tales fuentes no humanas incluyen, pero no se limitan a, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc; véase, por ejemplo, Patente U.S. N° 4.816.567 y primates no humanos (por ejemplo, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc; véase, por ejemplo, Patente U.S. N° 5.750.105 y 5.756.096.

[0110] Como se señaló anteriormente, el término "anticuerpo" tal como se usa aquí abarca los anticuerpos humanizados. Por "humanizados" se entienden las formas de anticuerpos que contienen una secuencia mínima derivada de secuencias de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (también conocida como región determinante de complementariedad o CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como puede ser un ratón, rata, conejo, o primate no humano que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. La frase "región determinante de complementariedad" se refiere a secuencias de aminoácidos que definen conjuntamente la afinidad y la especificidad de la región Fv natural de un centro de unión de inmunoglobulina nativa. Véase, por ejemplo, Chothia et al (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat et al (1991) Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Publicación NIH N° 91-3242). La frase "región constante" se refiere a la porción de la molécula de anticuerpo que confiere funciones efectoras. En trabajos anteriores dirigidos a la producción de anticuerpos no inmunogénicos para uso en terapia de enfermedades humanas, las regiones constantes de ratón se sustituyeron por las regiones constantes humanas. Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados de sujetos fueron derivadas de inmunoglobulinas humanas. Sin embargo, estos anticuerpos humanizados pueden provocar una respuesta inmune no deseada y potencialmente peligrosa en seres humanos y hubo pérdida de afinidad.

[0111] La humanización se puede realizar siguiendo el método 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), mediante la sustitución de secuencias CDRs o CDR de roedores o roedores mutantes por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véase también: Patentes U.S. N° 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 sustituyen por los correspondientes residuos no humanos (véase, por ejemplo, Patente U.S. N° 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6,180,370). Además, los anticuerpos humanizados pueden incluir residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se

realizan para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo (por ejemplo, para obtener la afinidad deseada). En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en 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. El anticuerpo humanizado opcionalmente también incluirá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles véase 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, dichos anticuerpos "humanizados" pueden incluir anticuerpos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos del marco están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Véase, por ejemplo, Patente U.S. Nº 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Véase también Patente U.S. Nº. 6.180.370 y publicación Internacional Nº WO 01/27160, donde se describen los anticuerpos humanizados y técnicas para producir anticuerpos humanizados que tienen una afinidad mejorada para un antígeno predeterminado.

[0112] Los anticuerpos humanizados anti-CD40 también pueden producirse utilizando la tecnología Human Engineering™ (Xoma Ltd., Berkeley, California).

[0113] Los anticuerpos monoclonales humanizados anti-CD40 incluyen anticuerpos tales como SGN-40 (Tai et al. (2004) Cancer Res. 64:2846-52; Patente U.S. Nº 6.838.261), que es la forma humanizada del anticuerpo murino anti-CD40 SGN-14 (Francisco et al. (2000) Cancer Res. 60:3225-31), y los anticuerpos descritos en la Solicitud de Publicación de Patente U.S. Nº 2004/0120948.

[0114] La presente invención también puede practicarse utilizando anticuerpos xenogénicos o modificados producidos en un huésped mamífero no humano, más particularmente un ratón transgénico, que se caracteriza por loci de inmunoglobulina endógena inactivada (Ig). En tales animales transgénicos, los genes endógenos competentes para la expresión de las subunidades ligera y pesada de las inmunoglobulinas receptoras que se convierten en no funcionales y se sustituyen con los loci de inmunoglobulina humana análoga. Estos animales transgénicos producen anticuerpos humanos en ausencia sustancial de subunidades ligera o pesada de inmunoglobulina receptora. Véase, por ejemplo, U.S. Patent Nº 5.877.397 y 5.939.598.

[0115] Así, en algunas realizaciones, los anticuerpos totalmente humanos para CD40, por ejemplo, se obtienen inmunizando ratones transgénicos. Un ratón, por ejemplo, se obtiene utilizando tecnología XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), y se describe en las Patentes U.S. Nº 6.075.181, 6.091.001, y 6.114.598. Por ejemplo, para producir el anticuerpo CHIR-12.12, ratones transgénicos para el locus Ig G₁ humano de la cadena pesada y el locus κ humano de la cadena ligera se inmunizaron con células Sf 9 que expresan CD40 humano. Los ratones también pueden ser transgénicos para otros isotipos. Los anticuerpos anti-CD40 plenamente humanos útiles en los métodos de la presente invención se caracterizan por propiedades de unión similares a las exhibidas por el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12.

[0116] Como se señaló anteriormente, el término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria abarca también fragmentos de anticuerpos que pueden unirse al antígeno. "Fragmentos de anticuerpo" incluyen una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos, anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 10:1057-1062); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único centro de unión al antígeno, y un residual fragmento "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos centros de combinación de antígeno y es todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

[0117] "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un reconocimiento de antígeno completo y el centro de unión. Esta región consiste en una asociación no covalente de un dímero de un dominio variable compacto de una cadena pesada y una cadena ligera. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un centro de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión de antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que incluye sólo tres CDRs específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el centro de unión completo.

[0118] 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 unos pocos residuos en el extremo carboxi del dominio de la cadena pesada C_H1 que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab', en la que el residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos Fab' se producen mediante la reducción del

fragmento F(ab')₂ del puente disulfuro de la cadena pesada. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0119] Los fragmentos de un anticuerpo anti-CD40 son adecuados para uso en los métodos de la invención siempre que retengan la afinidad deseada del anticuerpo de longitud completa. Así, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 retendrá la capacidad para unirse al antígeno CD40. Tales fragmentos se caracterizan por propiedades similares a las del correspondiente anticuerpo de longitud completa. Así, por ejemplo, un fragmento de una longitud completa antagonista de anticuerpo anti-CD40 preferiblemente será capaz de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, y está libre de actividad agonista significativa pero exhibe actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 humano en una célula que expresa CD40. Tales fragmentos se denominan aquí como fragmentos de "unión a antígeno". Los fragmentos de un anticuerpo anti-CD40 para uso en los métodos de la invención también conservan preferentemente la capacidad de unirse al FcR o FcRs pertinente. Así, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anti-CD40 puede conservar la capacidad para unirse a FcγRIIIa. Así, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo de longitud completa anti-CD40 puede ser capaz de unirse específicamente a una superficie celular de antígeno CD40, y también capaz de unirse a FcγRIIIa sobre las células efectoras, tales como células asesinas naturales (NK). Tales fragmentos se denominan aquí como fragmentos de unión "FcR". Tales fragmentos incluirán generalmente al menos una parte del dominio constante de la cadena pesada.

[0120] Varias técnicas han sido desarrolladas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban *vía* digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al. (1992) *Diario de Bioquímica y Biofísica*. Métodos 24:107-117 (1992) y Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente mediante células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos de anticuerpos mencionadas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente desde *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al. (1992) *Bio/Tecnología* 10:163-167). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto.

[0121] Los fragmentos de unión a antígeno adecuados de un anticuerpo incluyen una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, F(ab')₂, y Fv y moléculas de anticuerpo de cadena única. Por "Fab" se entiende un fragmento monovalente de unión a antígeno de una inmunoglobulina que se compone de la cadena ligera y parte de la cadena pesada. Por F(ab')₂ se entiende un fragmento bivalente de unión a antígeno de una inmunoglobulina que contiene ambas cadenas ligeras y parte de ambas cadenas pesadas. Por fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" se entienden fragmentos que incluyen los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Véase, por ejemplo, Patentes U.S. N°. 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030, y 5.856.456. Generalmente, el polipéptido Fv incluye además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun (1994) en la *Farmacología de los Anticuerpos Monoclonales*, vol. 113, ed. Rosenberg y Moore (Springer-Verlag, Nueva York), pp 269-315. Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos antagonistas de anti-CD40 descritos en este documento también pueden unirse a una citotoxina para efectuar la destrucción de las células cancerosas diana, como se describe a continuación.

[0122] En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista del anticuerpo anti-CD40. Cuando estos anticuerpos unen el CD40 expuesto en la superficie de las células humanas, tales como células B humanas, no causan actividad agonista significativa. En algunas realizaciones, su unión a CD40 expuesto en la superficie de las células humanas resulta en la inhibición de la proliferación y diferenciación de estas células humanas. Los anticuerpos anti-CD40 adecuados para uso en los métodos de la invención incluyen los anticuerpos que pueden exhibir actividad antagonista hacia las células humanas normales y malignas que expresan el antígeno CD40 de la superficie celular.

[0123] Por "actividad agonista" se entiende que una sustancia funciona como un agonista. Un agonista se combina con un receptor en una célula e inicia una reacción o actividad que es similar o la misma que la iniciada por el ligando natural del receptor. Un agonista de CD40 induce cualquiera o todas, pero no sin limitarse a, las siguientes respuestas: proliferación y/o diferenciación de células B; regulación al alza de la adhesión intercelular a través de moléculas tales como ICAM-1, E-selectina, VCAM, y similares; secreción de citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF, y similares; transducción de señales a través del receptor CD40 por vías tales como TRAF (por ejemplo, TRAF2 y / o TRAF3), quinasas MAP tales como NIK (quinasa inductora NF-κB), quinasas I-κappa B (IKK α/β), factor de transcripción NF-κB, Ras y la vía MEK/ERK, la vía PI3K/AKT, la vía P38 MAPK, y similares; transducción de una señal anti-apoptótica por moléculas tales como XIAP, Mcl-1, bcl-x, y similares; generación de memoria de células B y/o T; producción de anticuerpos de células B; cambio de isotipo de células B, sobrerregulación de la expresión de la superficie celular de MHC Clase II y CD80/86, y similares.

[0124] Por actividad "significativa" agonista se entiende una actividad agonista de al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% mayor que la actividad agonista inducida por una sustancia

neutra o un control negativo según se mide en un ensayo de respuesta de células B. Preferiblemente, 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 un ensayo de respuesta de células B. Así, por ejemplo, donde la respuesta de interés de células B es la proliferación de células B, la actividad agonista "significativa" sería la inducción de un nivel de proliferación de células B que sea 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 IgG1, que no se une a CD40 sirve como control negativo. Una sustancia "exenta de actividad agonista significativa" presentaría una actividad agonista de 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, un 15% mayor, un 10% mayor, un 5% mayor, un 1% mayor, un 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 un ensayo de respuesta de células B.

[0125] 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, especialmente CD40L. El antagonista puede reducir la inducción de una cualquiera o más de las respuestas a la unión del agonista en un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferiblemente en un 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, más preferiblemente en un 70%, 80%, 85%, y aún más preferiblemente en un 90%, 95%, 99%, o 100%. Los métodos para medir la especificidad de unión al ligando CD40 y la actividad antagonista de un agente terapéutico anti-CD40, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD40, se conocen en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, los ensayos estándar de unión competitiva, ensayos para el control de secreción de inmunoglobulina por parte de las células B, ensayos de proliferación de células B, ensayos de proliferación de células B de Tipo Banchereau, ensayos de células T auxiliares para la producción de anticuerpos, ensayos de co-estimulación de proliferación de células B, y ensayos para regulación al alza de los marcadores de activación de células B. Véase, por ejemplo, tales ensayos descritos en WO 00/75348 y Patente U.S. N° 6.087.329. Véase también WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294WO.

[0126] La falta de actividad agonista del antagonista se puede evaluar por ensayos que muestran que CHIR-12.12 carecen de actividad agonista. Los ensayos adecuados se muestran en los ensayos descritos en la Patente U.S. 5677165 (Chiron Corporation).

[0127] En una realización de la invención, el antagonista del anticuerpo anti-CD40 está libre de actividad agonista significativa en una respuesta celular. En otra realización de la invención, el antagonista del anticuerpo anti-CD40 está libre de actividad agonista significativa en ensayos de más de una respuesta celular (por ejemplo, proliferación y diferenciación, o proliferación, diferenciación, y, para las células B, producción de anticuerpos).

[0128] De particular interés son los antagonistas de anticuerpos anti-CD40 que están libres de actividad agonista significativa como se define aquí, pero exhiben actividad antagonista cuando se unen al antígeno CD40 en células B humanas. En una realización de la invención, el antagonista del anticuerpo anti-CD40 está libre de actividad agonista significativa en una respuesta de células B. En otra realización de la invención, el antagonista del anticuerpo anti-CD40 está libre de 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).

[0129] Cualquiera de los ensayos conocidos en la técnica se puede utilizar para determinar si un anticuerpo anti-CD40 actúa como antagonista de una o más respuestas de células B. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 actúan como un antagonista de al menos una respuesta de células B seleccionado de entre el grupo que consiste en la proliferación de células B, diferenciación de células B, producción de anticuerpos, adhesión intercelular, generación de memoria de células B, cambio de isotipo, sobreexpresión de la expresión de la superficie celular de MHC Clase II y CD80/86, y secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-8, IL-12 y TNF. De particular interés son los antagonistas de anticuerpos anti-CD40 que están libres de actividad agonista significativa con respecto a la proliferación de células B cuando se une al antígeno CD40 humano en la superficie de una célula B humana.

[0130] El anticuerpo anti-CD40 puede ser un antagonista de la proliferación de células B inducida por el CD40L soluble o de la superficie celular, como se mide en un ensayo de proliferación de células B. Los ensayos adecuados de proliferación de células B son conocidos en la técnica. Los ensayos adecuados de proliferación de células B también se describen a continuación. En algunas realizaciones, el antagonista del anticuerpo anti-CD40 estimula la proliferación de células B a un nivel que no es más de aproximadamente un 25% mayor que la proliferación de células B inducida por una sustancia neutra o un control negativo, preferentemente no más de aproximadamente un 20% mayor, un 15 % mayor, un 10% mayor, un 5% mayor, un 1% mayor, un 0,5% mayor, o incluso no más de aproximadamente un 0,1% mayor que la proliferación de células B inducida por una sustancia neutra o un control negativo.

[0131] En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de células B que es inducida por otro anticuerpo anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 S2C6, como se mide en una proliferación de las células B, y el nivel la proliferación de células B estimulada por el otro anticuerpo anti-CD40 en la presencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de aproximadamente un 25% de la proliferación de células B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 (es decir, al menos 75% de inhibición), preferiblemente no más de aproximadamente un 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, o incluso no más de aproximadamente un 0,1% de la proliferación de células B inducida por el otro anticuerpo anti-CD40 en ausencia del antagonista del anticuerpo anti-CD40.

[0132] En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la proliferación de células B que es inducida por la línea celular EL4B5 como se mide en un ensayo de activación de células B, y el nivel de proliferación de células B estimulada por la línea celular EL4B5 en presencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de aproximadamente el 25% de la proliferación de células B inducida por esta línea celular en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 (es decir, al menos un 75% de inhibición), preferiblemente no más de aproximadamente un 20 %, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, o incluso no más de aproximadamente un 0,1% de la proliferación de células B inducida por esta línea celular en ausencia del antagonista del anticuerpo anti-CD40.

[0133] En otras realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 es un antagonista de la producción de anticuerpos humanos de células T inducidas por células B humanas como se mide en el ensayo de células T humanas auxiliares para la producción de anticuerpos por parte de las células B. De esta manera, el nivel de producción de anticuerpos IgG, producción de anticuerpos IgM, o producción de anticuerpos tanto de IgG como de IgM por parte de las células B estimuladas por las células T en presencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de aproximadamente el 50% de la producción respectiva del anticuerpo por parte de las células B estimuladas por las células T en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40 (es decir, al menos un 75% de inhibición), preferiblemente no más de aproximadamente un 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% , 0,5%, o incluso no más de aproximadamente un 0,1% de la producción de anticuerpos respectivos por parte de células B estimuladas por las células T en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40. Otros anticuerpos antagonistas anti-CD40 incluyen los anticuerpos monoclonales que se mencionan como 5D12, 3A8 y 3C6, que son secretadas por un hibridoma que tiene como números de acceso de la ATCC HB 11339, HB 12024 y HB 11340, respectivamente. Véase, por ejemplo, Patente U.S. N° 6.315.998.

[0134] Por ejemplo, los siguientes ensayos pueden utilizarse para evaluar la actividad antagonista de un anticuerpo anti-CD40. Las células B humanas para estos ensayos puede obtenerse, por ejemplo, por aislamiento de las amígdalas obtenidas de individuos sometidos a amigdalectomía, esencialmente como se describe en De Groot *et al.* (1990) *Investigación Linfocina* (1990) 9:321. Brevemente, el tejido se dispersa con hojas de bisturí, las células fagocíticas y NK se agotan por tratamiento con 5 mm de metil éster de L-leucina y las células T se eliminan mediante un ciclo de formación de rosetas con eritrocitos de oveja (SRBC) tratadas con bromuro de 2-aminoetil isotiouronio. La pureza de las preparaciones de linfocitos B resultantes se puede comprobar por medio del etiquetado de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-(CD20) mAb B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) o anti-(CD3) mAb OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) y un fragmento FITC conjugado F(ab')₂ de conejo anti-(ratón Ig) (Zymed, San Francisco, CA), y el análisis FACS.

Ensayo de proliferación de células B

[0135] Células B (4 x 10⁴ por pocillo) se cultivaron en IMDM I 200 suplementado con suero de ternera fetal al 10% en fondo plano de 96 pozos de placas de microtitulación. Las células B se estimulan por la adición de anticuerpos inmovilizados anti-(IgM) (inmunoperlas; 5µg/ml; BioRad, Richmond, California). Cuando se desea, se añaden 100 U/ml de IL-2 recombinante. Las concentraciones variables de anticuerpos de prueba monoclonales (mAb) se añaden al inicio de la microcultivos y la proliferación se evalúa en el día 3 por medición de la incorporación de (³H)-timidina después de 18 horas pulsando. Un anticuerpo antagonista anti-CD40 no coestimula significativamente la proliferación de células B humanas en presencia de anti-IgM inmovilizado o en presencia de anti-IgM y IL-2 inmovilizado.

Ensayo de proliferación de celulas B de tipo Banchereau

[0136] Para probar la capacidad de los anticuerpos anti-CD40 monoclonales para estimular la proliferación de células B en un sistema de cultivo análogo al descrito por Banchereau *et al.* (1991) *Science* (1991) 251:70, se utilizan células transfectantes de ratón 3T6 que expresan la forma alélica HR de FcγRII humano. Las células B (2 x 10⁴ por pocillo) se cultivan en pocillos de fondo plano en presencia de 1 x 10⁴ células transfectantes (irradiadas con 5000 Rad) en 200 µl de IMDM suplementado con 10% de suero de ternera fetal al y 100 U/ml de IL-4 recombinante. Antes de la adición de las células B, las células 3T6 pueden adherirse al cultivo plástico durante al menos 5 horas. Se añaden anti-CD40 mAbs a concentraciones que varían desde 15 ng/ml a 2000 ng/ml y la proliferación de las células B se evalúa por medición de la incorporación de timidina en el día 7, después de 18 horas pulsando con [³H] timidina.

Inhibición de la proliferación de células B estimulada por S2C6 Usando Antagonistas Anti-CD40 mAbs

[0137] Los anticuerpos monoclonales antagonistas anti-CD40 (mAbs) también puede estar caracterizados por su capacidad para inhibir la estimulación de la proliferación de células B por un anticuerpo anti-CD40, tales como S2C6 (también conocido como SGN-14, que al parecer es un agonista de estimulación de CD40 de la proliferación de las células B normales; Francisco et al. (2000) Cancer Res. 60:3225-3231) Utilizando el ensayo de proliferación de células B descrito anteriormente. Las células B tonsilares humanas (4×10^4 por pocillo) se cultivaron en 200 μ l en micropocillos en presencia de anti-IgM acoplado a perlas de sefarosa (5 μ g/ml) y anti-CD40 mAb S2C6 (1,25 μ g/ml). Varias concentraciones de un anti-CD40 mAb de interés se añaden y se evalúa [3 H]-timidina después de 3 días. Como control se puede añadir anti-(glucocerebrosidasa) mAb 8E4 en concentraciones similares. Barneveld et al. (1983) Eur. J. Biochem. 134:585. Un anticuerpo antagonista anti-CD40 puede inhibir la coestimulación de proliferación inducida de células B humanas anti-IgM por mAb S2C6, por ejemplo, por lo menos un 75% o más (es decir, la proliferación estimulada por S2C6 en presencia de un anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de un 25% de la observada en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40). En cambio, ninguna inhibición significativa se observaría con cantidades equivalentes de mAb 8E4 no relevante, dirigidas a β -glucocerebrosidasa. Barneveld et al., *supra*. Este resultado indicaría que los anti-CD40 mAb no entregan señales estimuladoras para la proliferación de células B humanas, pero, a la inversa, pueden inhibir señales estimuladoras ejercidas mediante la activación de CD40 con otro mAb.

Ensayo de Activación de Células B con Células EL4B5

[0138] Zubler et al. (1985) J. Immunol. (1985) 134:3662 observaron que un subclón mutante del timoma de ratón línea EL-4, conocido como EL4B5, podría estimular fuertemente a las células B de origen tanto humano como murino para proliferar y diferenciarse en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina *in vitro*. Esta activación se observó como independiente de antígeno y no restringida a MHC. Para la estimulación óptima de células B humanas, la presencia de sobrenadante de células T humanas activadas era necesaria, pero una respuesta de células B también se produjo cuando las células EL4B5 se preactivaron con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) o 1-IL. Zubler et al. (1987) Comentarios inmunológicos 99:281; Y Zhang et al. (1990) J. Immunol. 144:2955. La activación de células B en este sistema de cultivo es eficiente - experimentos de dilución limitantes han demostrado que la mayoría de las células B humanas se puede activar para proliferar y diferenciarse en células secretoras de anticuerpos. Wen et al. (1987) Eur. J. Immunol. 17:887.

[0139] Las células B (1000 por pocillo) se cultivan junto con células EL4B5 irradiadas (5000 Rad) (5×10^4 por pocillo) en placas de microtitulación de fondo en 200 μ l IMDM suplementadas con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 5 ng/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (Sigma) y 5% de sobrenadante de células T humanas. Se añaden mAbs a concentraciones variables en el comienzo de los cultivos y la incorporación de timidina se evalúa en el día 6 después de 18 horas pulsando con [3 H]-timidina. Para la preparación de sobrenadante de células T, se cultivaron células T purificadas a una densidad de 10^6 /ml durante 36 horas en presencia de 1 mg/ml de PHA y 10 ng/ml de PMA. Wen et al. (1987) Eur. J. Immunol. (1987) 17:887. Se obtiene sobrenadante de células T por centrifugación de las células y se almacena a -20 ° C. La eficacia de los sobrenadantes de las células T en la mejora de la proliferación de células B humanas en cultivos celulares EL4B5-B se prueban y los sobrenadantes más eficaces se combinan para su uso en los experimentos. Al evaluar el efecto de un anticuerpo anti-CD40 en proliferación de células B humanas inducida por EL4B5, un anticuerpo monoclonal tal como MOPC-141 (IgG2b) se puede añadir como control.

[0140] Un antagonista de anticuerpo anti-CD40 puede inhibir la proliferación de células B estimulada por la línea de células EL4B5, por ejemplo, por lo menos en un 75% o más (es decir, la proliferación de células B inducida por EL4B5 en presencia de un anticuerpo antagonista anti-CD40 no es más de 25% de la observada en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40). En contraste, un anticuerpo de control, como MOPC-141 no tendría ningún efecto significativo sobre la proliferación de células B inducida por EL4B5.

Ensayo de Célula T Auxiliar Humana para la Producción de Anticuerpos por las Células B

[0141] Un anticuerpo antagonista anti-CD40 puede funcionar como un antagonista de la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B. Un anticuerpo anti-CD40 puede ser probado para este tipo de actividad antagonista mediante la evaluación de la capacidad del anticuerpo para inhibir la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B que han sido estimuladas de una manera dependiente del contacto con las células T activadas en un ensayo de célula T auxiliar. De esta manera, placas de cultivo de tejidos 96 pocillos se recubren con una dilución 1:500 de fluido ascítico de anti-CD3 mAb CLB-T3/3 (CLB, Amsterdam, Países Bajos). Como se indica se añaden mAbs coestimulantes: anti CD2 mAbs CLB-T11.1/1 y CLB-T11.2/1 (CLB, Amsterdam, Países Bajos), ambas 1:1000 ascitis y anti-CD28 mAb CLB-28/1 (CLB, Amsterdam, Países Bajos). Posteriormente se añaden las células T tonsilares (irradiadas, 3000 Rad, 10^5 por pocillo), las células B tonsilares (10^4 por pocillo), y rIL-2 (20 U/ml). El volumen final de cada cultivo celular es de 200 μ l. Después de 8 días, las células se centrifugan y el sobrenadante libre de células se cosecha. Las concentraciones de muestras IgM humana y IgG (diluida) se calculan mediante ELISA como se describe a continuación.

[0142] En una realización, las células B tonsilares humanas (10^4 /pocillo) se cultivan junto con células T purificadas e irradiadas (3000 rad, 10^5 / Pocillo) en placas de 96 pocillos, recubiertas con anti-CD3 mAb y con o sin mAbs diferentes para coestimular las células T. Después de 8 días de cultivo los sobrenadantes se recogen para la determinación de la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B. La producción de inmunoglobulinas por parte las células B se evalúa mediante el ensayo ELISA descrito a continuación. El anticuerpo anti-CD40 de interés se añade en concentraciones variables desde el comienzo de los cultivos. Para control, se puede añadir, mAb MOPC-141.

[0143] Un anticuerpo antagonista anti-CD40 puede inhibir la producción de anticuerpo IgG e IgM de células B estimuladas por las células T humanas por lo menos en un 50% o más (es decir, producción de anticuerpos inducida por células T por parte de células B en presencia de un anticuerpo antagonista anti-CD40 es no más de un 50% de la observada en ausencia del anticuerpo antagonista anti-CD40). En contraste, un anticuerpo de control, como MOPC-141 no tendría ningún efecto significativo sobre la producción de anticuerpos inducida por células T por parte de células B.

Ensayo ELISA para la Cuantificación de Inmunoglobulinas

[0144] Las concentraciones de IgM e IgG humano se estiman mediante ELISA. Placas ELISA 96 pocillos se recubren con 4 µg/ml IgG mAb MH 16-01 anti-humano de ratón (CLB, Amsterdam, Países Bajos) o con 1,2 µg/ml de IgM mAb 4102 anti-humano de ratón (Tago, Burlingame, CA) en 0,05 M de tampón carbonato (pH = 9,6), mediante incubación durante 16 horas a 4 °C. Las placas se lavan 3 veces con PBS-0.05% Tween-20 (PBS-Tween) y se saturan con BSA durante 1 hora. Después de 2 lavados, las placas se incuban durante 1 hora a 37 °C con diferentes diluciones de las muestras de ensayo. Después de 3 lavados, se detecta la unión Ig por incubación durante 1 hora a 37° C con 1 µg/ml IgG mAb MH 16-01 anti-humano de ratón marcado con peroxidasa (CLB) o IgM mAb MH 15-01 anti-humano de ratón (CLB). Las placas se lavan 4 veces y la actividad peroxidasa unida se revela mediante la adición de o-fenilendiamina como sustrato. El suero humano estándar (H00, CLB) se utiliza para establecer una curva estándar para cada ensayo.

[0145] Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el anticuerpo humano anti-CD40 anticuerpo producido por el hibridoma designado F4-465 descrito en la Solicitud de Aplicación de Patente U.S. Nº 20020142358 y 20030059427. Se obtuvo F4-465 a partir del ratón HAC (Kuroiwa et al. (2000) Nature Biotech. 10:1086 (2000)) Y por lo tanto, expresa la cadena ligera humana lambda. Véase también WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294WO.

[0146] Además de la actividad antagonista, el anticuerpo anti-CD40 para uso en los métodos de la presente invención tiene, preferiblemente, otro mecanismo de acción contra una célula diana. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 tendrá preferiblemente actividad ADCC. Alternativamente, las regiones variables del anticuerpo anti-CD40 pueden expresarse en otro isotipo de anticuerpos que tenga actividad ADCC. También es posible conjugar formas nativas, formas recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos anti-CD40 a una citotoxina, un agente terapéutico, o un ión metálico radioactivo o radioisótopo, como se describe adicionalmente en este documento.

[0147] Como se explica en otra parte en la presente memoria, los inventores han hecho el sorprendente hallazgo de que, contrariamente a otros anticuerpos, los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, son capaces de mediar la potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células diana que expresan CD40 a través la unión a cualquiera de las dos aminoácidos alotipos FcγRIIIa158 (V o F) sobre las células asesinas naturales de un paciente humano (NK). Por consiguiente, los anticuerpos anti-CD40, tales como CHIR-12.12, se pueden utilizar en el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas asociados a las células que expresan CD40 en pacientes humanos homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), además de los pacientes humanos homocigotos para FcγRIIIa-158V (genotipo V/V). La presente invención es especialmente ventajosa para el tratamiento de cánceres y condiciones premalignas que no son sensibles al tratamiento con rituximab (Rituxan®), porque la actividad clínica de rituximab en NHL se ha demostrado como correlacionada con el genotipo FcγRIIIa del paciente.

[0148] Por lo tanto, anticuerpos anti-CD40 preferidos de manera particular para su uso en los métodos de la presente invención son aquellos que, además de contar con la actividad antagonista, son capaces de mediar la ADCC de células que expresan CD40 por parte de células efectoras, tales como las células asesinas naturales (NK) que expresan FcγRIIIa. Los más preferidos son los anticuerpos anti-CD40 que son capaces de unirse tanto a FcγRIIIa-158F como a FcγRIIIa-158V con alta afinidad, como se describe adicionalmente en este documento.

[0149] Los anticuerpos anti-CD40 particularmente preferidos son los descritos en WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294WO.

[0150] De particular interés para la presente invención son los anticuerpos antagonistas anti-CD40 que comparten las características de unión del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 descrito en WO 2005/044854, WO 2005/044304,

WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294. Tales anticuerpos incluyen, sin limitarse a, los siguientes:

- a) el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12;
- b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12;
- c) un anticuerpo monoclonal que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5, las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5;
- d) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, y ambas secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3;
- e) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12.12;
- f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que incluye los residuos 82-87 de la secuencia humana CD40 mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que incluye los residuos 82-89 de la secuencia humana CD40 mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- h) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva;
- i) el anticuerpo monoclonal del punto a) anterior o un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores c)-h), en el que dicho anticuerpo se produce de manera recombinante; y
- j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de los puntos precedentes a)-i), en el que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

[0151] El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 es particularmente preferido para su uso en los métodos de la presente invención.

[0152] El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 se describe con detalle en WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294. El CHIR-12.12 es un anticuerpo monoclonal anti-CD40 totalmente humano del isotipo IgG₁ producido a partir de la línea celular del hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (denominada como línea celular 12.12). La línea celular se ha creado usando esplenocitos de ratones xenotípicos inmunizados que contienen el locus IgG₁ humano de cadena pesada y el locus κ humano de cadena (XenoMouse[®] technology; Abgenix; Fremont, California). Las células del bazo se fusionaron con las células de mieloma de ratón SP2/0 (Sierra BioSource). Los hibridomas resultantes se subclonaron varias veces para crear la línea celular monoclonal estable 12.12. Otros anticuerpos adecuados para uso en los métodos de la invención pueden prepararse de manera similar usando ratones transgénicos para loci de inmunoglobulina humana, tal como se describe en este documento.

[0153] El anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 une el CD40 soluble en ensayos de tipo ELISA, impide la unión de ligando CD40 a la superficie celular CD40, y desplaza el ligando CD40 pre-unido, tal como 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 Solicitud Provisional U.S. Serie No. 60/237.556, Titulada "Anticuerpo Humanos anti-CD40", Presentada el 02 de octubre de 2000, y PCT International Application No. PCT/US01/30857, También titulado "Humanos anticuerpos anti-CD40", Presentada el 02 de octubre 2001 (Expediente N ° PP16092.003) y publicada como WO 2002/028904. Cuando se prueba *in vitro* para observar sus efectos sobre la proliferación de células B de sujetos humanos normales, CHIR-12.12 actúa como el anticuerpo antagonista anti-CD40. Además, CHIR-12.12 no induce una fuerte proliferación de linfocitos humanos de sujetos normales. El anticuerpo es capaz de matar a las células diana que expresan CD40 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La afinidad de unión de CHIR-12.12 a CD40 humano es 5×10^{-10} M, como se determina por el ensayo Biacore[™].

[0154] Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables del anticuerpo CHIR-12.12 se proporcionan en el presente documento. Más particularmente, las secuencias de aminoácidos para las regiones líder, variable y constante de la cadena ligera y cadena pesada para el mAb CHIR-12.12 se exponen en SEQ ID NO: 2 (secuencia completa para la cadena ligera del mAb CHIR-12.12), SEQ ID NO: 4 (secuencia completa para la cadena pesada para el mAb CHIR-12.12), y SEQ ID NO: 5 (secuencia completa para una variante de la cadena pesada para mAb CHIR-12.12 mostrada en SEQ ID NO: 4, donde la variante comprende una sustitución de serina para el residuo de alanina en la posición 153 de la SEQ ID NO: 4). Las secuencias de nucleótidos que codifican la cadena ligera y cadena pesada para mAb CHIR-12.12 se exponen en SEQ ID NO: 1 (secuencia de codificación para la cadena ligera para mAb CHIR-12.12) y SEQ ID NO: 3 (secuencia codificadora para la cadena pesada para mAb CHIR-12.12). Los hibridomas que expresan el anticuerpo CHIR-12.12 se han depositado en la ATCC con una denominación de depósito de patente PTA-5543.

[0155] Los anticuerpos anti-CD40 para su uso en los métodos de la presente invención incluyen anticuerpos que difieren del anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, pero conservando las CDR, y los anticuerpos con una o más de adiciones, eliminaciones o sustituciones de amino ácidos. Los anticuerpos anti CD40 para su uso en los métodos de la presente invención también pueden ser anticuerpos desinmunizados, en particular anticuerpos antagonistas anti-CD40 desinmunizados, que pueden producirse como se describe en, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N° WO 98/52976 y WO 0034317. De esta manera, los residuos dentro de los anticuerpos antagonistas anti-CD40 de la invención se modifican con el fin de hacer que los anticuerpos sean no inmunogénicos o poco inmugénicos para los humanos mientras que conservan su actividad antagonista hacia células humanas que expresan CD40, en el que dicha actividad se mide por ensayos de señalados en otra parte de este documento. También se incluyen dentro del alcance de la presente invención las proteínas de fusión que incluyen un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40 o un anticuerpo antagonista anti-CD40L, o un fragmento del mismo, en los que las proteínas de fusión pueden sintetizarse o expresarse a partir vectores de polinucleótidos correspondientes, como se conoce en la técnica. Tales proteínas de fusión se describen con referencia a la unión de anticuerpos como se señala en este documento.

[0156] Cualquier anticuerpo conocido que tiene la especificidad de unión de interés puede tener variaciones de secuencia producidas usando métodos descritos en, por ejemplo, las Publicaciones de Patente N° EP 0983303 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 de Clase II y desencadene una respuesta no deseada de células T auxiliares. Una sustitución conservadora puede permitir que el anticuerpo conserve la actividad de unión aunque pierda su capacidad para desencadenar una respuesta no deseada de células T. Cualquiera de tales sustituciones conservadoras o no conservadoras se pueden hacer usando métodos reconocidos en la técnica, tales como los señalados en otra parte de este documento, y los anticuerpos resultantes también se pueden utilizar en los métodos de la presente invención. Los anticuerpos variantes pueden probarse de manera rutinaria para la actividad particular, por ejemplo, actividad antagonista, afinidad y especificidad usando métodos descritos en el presente documento.

[0157] Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo antagonista anti-CD40, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12, se pueden preparar por mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los métodos para mutagénesis y alteraciones de secuencias de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Walker y Gaastra, eds. (1983) Técnicas de Biología Molecular (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82:488-492; Kunkel et al. (1987) Métodos Enzimol. 154:367-382; Sambrook et al. (1989) Clonación Molecular: Un Manual de Laboratorio (Cold Spring Harbor, Nueva York); Patente U.S. No. 4.873.192, y las referencias allí citadas. La orientación en cuanto a las sustituciones de aminoácidos que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff et al. (1978) en el Atlas de secuencia de proteínas y estructura (National Biomed. Res. Found., Washington, DC.). Las sustituciones conservadoras, tales como el intercambio de un aminoácido con otro que tenga propiedades similares, pueden ser preferibles. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen, pero no se limitan a, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln, y Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr.

[0158] En la construcción de las variantes de un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40 polipéptido de interés, se realizan modificaciones de tal manera que esas variantes siguen poseyendo la actividad deseada, es decir, afinidad de unión similar y, en el caso de anticuerpos antagonistas anti-CD40, son capaces de unirse específicamente a un antígeno CD40 humano expresado en la superficie de una célula humana, y que están libres de actividad agonista significativa pero exhiben actividad antagonista cuando se unen a un antígeno CD40 humano en una célula que expresa CD40. Obviamente, cualquier mutación realizada en el ADN que codifica el polipéptido variante no debe colocar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no creará regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Ver EP Solicitud de Publicación de Patente N° 75,444.

[0159] Además, la región constante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40, puede mutarse para alterar la función efectora en una serie de formas. Por ejemplo, véase Patente U.S. N° 6.737.056B1 y Solicitud de Publicación de Patente U.S. N° 2004/0132101A1, que dan a conocer mutaciones de Fc que optimizan la unión de anticuerpos a los receptores Fc.

[0160] Preferiblemente, las variantes de un anticuerpo de referencia, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40, tienen secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 70% o 75% de identidad de secuencia, preferiblemente al menos un 80% o 85% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos un 90 %, 91%, 92%, 93%, 94% o 95% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos para el anticuerpo de referencia, por este documento , o a una porción más corta de la molécula de anticuerpo de referencia. Más preferiblemente, las moléculas que comparten al menos un 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia. Para los fines de la presente invención, el porcentaje de identidad de secuencia se determina usando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman con una búsqueda de brecha afín con una penalización de hueco abierto de 12 y una 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 de referencia, por ejemplo, un anticuerpo antagonista anti-CD40, por tan pocos como 1 a 15

residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 a 10 residuos de aminoácidos, como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

[0161] Con respecto a la alineación óptima de las dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener residuos de aminoácidos adicionales o residuos de aminoácidos eliminados con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación de la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos, y puede ser de 30, 40, 50, o más residuos de aminoácidos. Se pueden hacer correcciones para la identidad de secuencia asociada con sustituciones conservadoras de residuos o brechas (ver Smith-Waterman algoritmo de búsqueda de homología).

[0162] La estructura química exacta de un polipéptido capaz de unirse específicamente a CD40 y que conserva la actividad antagonista, en particular cuando se une al antígeno CD40 en células B malignas, depende de una serie de factores. Al estar presentes los grupos ionizables de amino y carboxilo en la molécula, un polipéptido particular se puede obtener como una sal ácida o básica, o en forma neutra. Todas esas preparaciones conservan su actividad biológica cuando se colocan en condiciones ambientales adecuadas que se incluyen en la definición de anticuerpos antagonistas anti-CD40, como se usa en la presente memoria. Además, la secuencia primaria de aminoácidos del polipéptido puede aumentar por derivatización usando restos de azúcar (glicosilación) o por otras moléculas complementarias tales como lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares. También puede aumentarse por conjugación con sacáridos. Ciertos aspectos de tal aumento se consiguen a través de sistemas de procesamiento postraduccionales del huésped productor; otras modificaciones tales pueden introducirse *in vitro*. En cualquier caso, tales modificaciones se incluyen en la definición de un anticuerpo anti-CD40 usado aquí, siempre que las propiedades del anticuerpo antagonista anti-CD40 no se destruyan. Se espera que tales modificaciones puedan afectar cuantitativamente o cualitativamente a la actividad, ya sea aumentando o disminuyendo la actividad del polipéptido en los diversos ensayos. Además, los residuos de aminoácidos individuales en la cadena pueden modificarse por oxidación, reducción, u otra derivación, y el polipéptido puede escindirse para obtener fragmentos que conservan la actividad. Tales alteraciones que no destruyen la actividad antagonista no eliminan la secuencia del polipéptido de la definición de anticuerpos anti-CD40 de interés según se usa en el presente documento.

[0163] La técnica proporciona orientación sustancial con respecto a la preparación y el uso de variantes del polipéptido. En la preparación de las variantes de anticuerpos anti CD40, un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué modificaciones a la secuencia de proteína nativa de nucleótidos o de aminoácidos se traducirá en una variante que sea adecuada para su uso como un componente terapéuticamente activo de una composición farmacéutica utilizada en los métodos de la presente invención.

[0164] El anticuerpo anti-CD40 para su uso en los métodos de la invención posee preferentemente al menos una de las siguientes actividades biológicas *in vitro* y/o *in vivo*: inhibición de la secreción de inmunoglobulina por parte de las células humanas normales B periféricas estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células humanas normales B periféricas estimuladas por células que expresan CD40L o ligando de CD40 soluble (sCD40L); inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células humanas normales B periféricas estimuladas por células T Jurkat; inhibición de "supervivencia" señales intracelulares anti-apoptóticas en cualquier célula estimulada por sCD40L o CD40L de fase sólida, y la inhibición de la transducción de señal de CD40 en cualquier célula tras la unión con sCD40L o CD40L en fase sólida, supresión, anergia y/o inducción de tolerancia de las células diana portadoras de CD40 o las células que portan ligandos afines a CD40 incluyendo, pero sin limitarse a, células T y células B, la inducción de la expansión o activación de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (véase, por ejemplo, rechazo de donantes de tejido aloantígeno específico a través de interferencia CD40-CD40L, van Maurik et al. (2002) J. Immunol. 169:5401-5404), Citotoxicidad a través de cualquier mecanismo (incluyendo, pero sin limitarse a, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), la baja regulación de la proliferación, y/o apoptosis en las células diana), la modulación de las células secreción de citoquinas en células diana y/o expresión de la molécula de superficie celular, y combinaciones de los mismos.

[0165] Los ensayos para dichas actividades biológicas se pueden realizar como se describe en la presente memoria y en las solicitudes provisionales tituladas "*Anticuerpos Monoclonales Antagonistas anti-CD40 y Métodos para su Uso*" presentada el 4 de noviembre 2003, 26 de noviembre de 2003, y 27 de abril de 2004, y asignadas a las Solicitudes de Patente U.S. N°. 60/517.337 (Expediente N° PP20107.001 (035784/258442)), 60/525, 579 (Expediente N° PP20107.002 (035784/271525)), y 60/565.710 (Expediente N° PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, y la Solicitud de Patente Internacional N°. PCT/US2004/037152 (Expediente N° PP20107.004 (035784/282916)), publicada como WO 2005/044854, también titulada "*Anticuerpos Monoclonales Antagonistas anti-CD40 y Métodos para su Uso*" presentada el 4 de noviembre de 2003. Véanse también los ensayos descritos en Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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 Supl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Protocolos Actuales en Inmunología 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) 79:439-444 Inmunología; y Patent U.S. N° 5.674.492 y 5.847.082.

[0166] Un ensayo representativo para detectar anticuerpos antagonistas anti-CD40 específicos para los epítomos del antígeno CD40 identificado en este documento es un "ensayo de unión competitiva". Los ensayos de unión competitiva son ensayos serológicos en los que las incógnitas se detectan y se cuantifican por su capacidad para inhibir la unión de un ligando marcado conocido a su anticuerpo específico. Esto también se conoce como un ensayo de inhibición competitiva. En un ensayo de unión competitiva representativo, un polipéptido marcado CD40 se precipitada por parte de anticuerpos candidatos en una muestra, por ejemplo, en combinación con anticuerpos monoclonales generados contra uno o más epítomos de los anticuerpos monoclonales de la invención. Los anticuerpos anti-CD40 que reaccionan específicamente con un epítomo de interés pueden identificarse por selección de una serie de anticuerpos preparados contra una proteína CD40 o fragmento de la proteína que incluye el epítomo particular de la proteína CD40 de interés. Por ejemplo, para CD40 humano, los epítomos de interés incluyen epítomos que comprenden residuos de aminoácidos lineales y/o no lineales de la isoforma corta de CD40 humano (véase GenBank N° de acceso NP_690593) expuesta en SEQ ID NO: 10, codificada por la secuencia establecida en SEQ ID NO: 9; véase también GenBank N° de acceso NM_152854), o de la isoforma larga de CD40 humano (véase GenBank números de acceso CAA43045 y NP_001241, expuesta en SEQ ID NO: 12, codificada por la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11; ver los números de acceso GenBank X60592 y NM_001250). Alternativamente, los ensayos de unión competitiva con anticuerpos antagonistas anti-CD40 adecuados identificados previamente podría utilizarse para seleccionar los anticuerpos monoclonales comparables a los anticuerpos identificados anteriormente.

[0167] Los anticuerpos empleados en tales inmunoensayos pueden estar marcados o no marcados. Los anticuerpos no marcados se pueden emplear en aglutinación; Los anticuerpos marcados se pueden emplear en una amplia variedad de ensayos, empleando una amplia variedad de etiquetas. La detección de la formación de un complejo anticuerpo antígeno entre un anticuerpo anti-CD40 y un epítomo de interés puede facilitarse fijando una sustancia detectable al anticuerpo. Los medios de detección adecuados incluyen el uso de etiquetas tales como radionúclidos, enzimas, coenzimas, fluorescentes, quimioluminiscentes, cromógenos, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores de enzimas, complejos de grupos prostéticos, radicales libres, partículas, colorantes y similares. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente es el luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa luciferina, y aequorina, y ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , o ^3H . Tales reactivos marcados pueden utilizarse en una variedad de ensayos bien conocidos, tales como radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, por ejemplo, ELISA, inmunoensayos fluorescentes, y similares. Véase, por ejemplo, Patentes U.S. N° 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; y 4.233.402.

[0168] También es posible diseñar un anticuerpo para tener una mayor actividad ADCC. Especialmente, la mitad carboxi-terminal del dominio CH2 es crítica para la ADCC mediada por el receptor de FcR111. Dado que las regiones CH2 y de bisagra tienen un papel importante en las funciones efectoras, una serie de varios dominios que contienen anticuerpos CH2 adicionales y/o regiones bisagra pueden ser creados e investigados por los cambios en la potencia efectora (véase Greenwood, J. Gorman, SD, Routledge, EG, Lloyd, IS & Waldmann, H., Ther Immunol. 1994 Oct; 1 (5) :247-55). Un enfoque alternativo puede ser para diseñar dominios adicionales en paralelo, por ejemplo, a través de la creación de dímeros por ingeniería de una cisteína en la cadena H de un Ig quimérico (véase Shopes B. (1992) J. Immunol. 1992 1; 148 (9): 2918-22). Además, los cambios para aumentar la actividad ADCC se pueden diseñar mediante la introducción de mutaciones en la región Fc (véase, por ejemplo, US 6.737.056 B1), Las células que expresan líneas celulares deficientes de fucosil transferasa (véase, por ejemplo, US2003/0115614), o efectúan otros cambios en la glicosilación de anticuerpos (véase, por ejemplo, US 6.602.684).

[0169] La presente invención es ventajosa para el tratamiento de cánceres que expresan CD40 y condiciones premalignas en los que un paciente es homocigoto o heterocigoto para el genotipo FcyRIIIa-158F.

[0170] Como se usa en la presente memoria, "anticuerpo anti-CD20" abarca cualquier anticuerpo que reconoce específicamente el antígeno CD20 de superficie celular, incluyendo anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos de cadena única, y sus fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, F_v, y otros fragmentos que conservan la función de unión al antígeno del anticuerpo matriz anti-CD20. De particular interés en relación con los métodos de la presente invención son los anticuerpos anti-CD20 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que tienen las propiedades de unión exhibidas por el anticuerpo monoclonal IDEC-C2B8 (Biogen Idec Inc., Cambridge, MA).

[0171] En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 utilizados en los métodos de la invención exhiben una actividad terapéutica más potente que el anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 IDEC-C2B8, donde la actividad antitumoral se ensaya con cantidades equivalentes de estos anticuerpos en un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo usando linfoma humano o líneas celulares de mieloma. IDEC-C2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; disponible comercialmente bajo el nombre comercial Rituxan®, también conocido como rituximab) es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20 que contiene IgG1 humana y regiones constantes kappa con regiones variables murinas aisladas de un anticuerpo monoclonal murino anti-CD20, IDEC-2B8 (Reff et al. (1994) Blood 83:435-445). Rituxan® está aprobada para el tratamiento de linfoma de células B recidivantes de bajo

grado o folicular no-Hodgkin (LNH). El descubrimiento de anticuerpos con terapéutica superior, en particular anti-tumor, comparando su actividad con Rituxan® podría mejorar drásticamente los métodos de terapia para cánceres y condiciones premalignas, tales como linfomas de células B, particularmente linfoma de células B no-Hodgkin.

[0172] Modelos adecuados de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo incluyen los que utilizan líneas celulares de linfoma de Burkitt conocidas como Namalwa y Daudi. Realizaciones preferidas prueban la actividad anti-tumoral en un modelo por etapas de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo utilizando la línea celular de linfoma de Daudi humano como se describe a continuación en el Ejemplo 7. Un modelo por etapas de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo utilizando la línea celular de linfoma de Daudi humano es más eficaz para distinguir la eficacia terapéutica de un anticuerpo dado que un modelo que no se realiza por etapas, ya que en el modelo de la dosificación de anticuerpos por etapas se inicia sólo después de que el tumor haya alcanzado un tamaño mensurable. En el modelo que no es por etapas, la dosificación de anticuerpos se inicia generalmente en aproximadamente 1 día de inoculación del tumor y antes de que esté presente un tumor palpable. La capacidad de un anticuerpo para superar a Rituxan® (es decir, para exhibir aumento de la actividad terapéutica) en un modelo por etapas es una fuerte indicación de que el anticuerpo será terapéuticamente más eficaz que Rituxan®. Por otra parte, en el modelo anti-CD20 de Daudi, el objetivo de Rituxan® se expresa en la superficie celular a un nivel más alto que en CD40.

[0173] Por "cantidad equivalente" del anticuerpo anti-CD40 de la invención y Rituxan® se entiende la misma dosis en mg que se administra sobre una base de peso. Así, cuando el anticuerpo anti-CD40 se dosifica a 0,01 mg/kg de peso corporal del ratón utilizado en el modelo de tumor, Rituxan® también se dosifica a 0,01 mg/kg de peso corporal del ratón. De manera similar, cuando el anticuerpo anti-CD40 se dosifica a 0,1, 1, o 10 mg/kg de peso corporal del ratón utilizado en el modelo de tumor, el Rituxan® también se dosifica a 0,1, 1, o 10 mg/kg, respectivamente, del peso corporal del ratón.

[0174] Cuando se administra en el modelo de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo, algunos anticuerpos anti-CD40 resultan en un volumen de tumor significativamente menor que con cantidad equivalente de Rituxan®. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal totalmente humano CHIR-12.12 exhibe al menos un incremento del 20% en la actividad antitumoral relativa a la observada con una dosis equivalente de Rituxan cuando se ensaya en el modelo por etapas de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo utilizando la línea celular de linfoma de Daudi humano de la manera descrita en el Ejemplo 7 en el presente documento, y pueden exhibir hasta un aumento del 50% al 60% en la actividad antitumoral en este ensayo. Este aumento de la actividad anti-tumoral se refleja en la mayor reducción en el volumen del tumor observado con el anticuerpo anti-CD40 de la invención en comparación con la dosis equivalente de Rituxan® o en la inducción de respuestas más completas. Así, por ejemplo, dependiendo de la cantidad de tiempo después de la inoculación del tumor, el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 puede mostrar un volumen del tumor que es de aproximadamente un tercio a aproximadamente la mitad de la observada para una dosis equivalente de Rituxan®.

[0175] Otra diferencia en la eficacia del anticuerpo es medir la concentración *in vitro* de anticuerpos necesaria para obtener la máxima lisis de las células tumorales *in vitro* en la presencia de células NK. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CD40 de la invención alcanzan lisis máxima de células Daudi a una EC₅₀ de menos de 1/2, y preferiblemente 1/4, y más preferiblemente, 1/10 de la concentración de Rituxan®. Este tipo de medida también se describe en los ejemplos de este documento.

[0176] Los anticuerpos anti-CD40 que se benefician de tener una eficacia significativamente mayor que cantidades equivalentes de Rituxan® en los ensayos descritos anteriormente pueden incluir:

- a) el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12;
- b) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12,12;
- c) un anticuerpo monoclonal que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5, las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, y las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5;
- d) un anticuerpo monoclonal que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, y ambas secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3;
- e) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 12,12;
- f) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que incluye los residuos 82-87 de la secuencia humana CD40 mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- g) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo que incluye los residuos 82-89 de la secuencia humana CD40 mostrada en SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9;
- h) un anticuerpo monoclonal que compite con el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 en un ensayo de unión competitiva;
- i) el anticuerpo monoclonal del punto a) anterior o un anticuerpo monoclonal de cualquiera de los puntos anteriores c)-h), en el que dicho anticuerpo se produce de manera recombinante; y

j) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de los puntos precedentes a)-i), en el que dicho fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente al antígeno CD40 humano.

5 **[0177]** La presente invención proporciona un método para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40, que incluye:

- 10 a) la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40; y
b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);

15 en el que dicho cáncer o condición premaligna es tratable con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F). El cáncer o condición premaligna puede ser refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®)

20 **[0178]** Una vez que un paciente humano con un cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 se ha identificado, ese paciente humano puede ser tratado con un anticuerpo anti-CD40. Por lo tanto, el método puede incluir la etapa adicional de (c) administrar a un paciente humano identificado como homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F) una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

25 **[0179]** Este método de identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 se puede realizar fácilmente por parte de una persona experta en la técnica, usando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe incluir reactivos adecuados para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano. El invento también facilita un kit para la identificación de un paciente humano con cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40, que incluye los reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano. Se describen los kits adecuados con más detalle en otra parte del presente documento.

30 **[0180]** La invención también proporciona un método para seleccionar una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene un cáncer o condición premaligna, que incluye:

- 35 a) identificar un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40; y
b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F);

40 donde, si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), se selecciona un anticuerpo anti-CD40 para el tratamiento de dicho cáncer o condición premaligna. El cáncer o condición premaligna puede ser refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®).

45 **[0181]** Una vez que una terapia de anticuerpos anti-CD40 para el tratamiento de un paciente humano que tiene una condición de cáncer o premalignas ha sido seleccionada, ese paciente humano puede ser tratado con un anticuerpo anti-CD40. Por lo tanto, el método puede incluir la etapa adicional de (c) administrar a un paciente humano identificado como homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F) una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40.

50 **[0182]** Este método de selección de una terapia de anticuerpos para un paciente humano con cáncer o condición premaligna se puede realizar fácilmente por parte de una persona experta en la técnica, usando un kit de diagnóstico adecuado. El kit debe incluir reactivos adecuados para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano. Por ello, la invención también facilita selección de una terapia de anticuerpos para un paciente humano con cáncer o condición premaligna asociada con células que expresan CD40, que incluye los reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano, incluidos los reactivos para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano

55 **[0183]** Por "tratable con un anticuerpo anti-CD40" se entiende al paciente humano (es decir, un individuo con un cáncer o condición premaligna), que cuando se trata con el anticuerpo anti-CD40, se beneficiaría de una "respuesta terapéutica positiva" (como se define en otra parte de este documento) con respecto al cáncer o condición premaligna para el que se busca tratamiento.

60 **[0184]** Se contempla cualquier método para la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano.

65 **[0185]** Por ejemplo, se describe aquí un kit para su uso en la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de un paciente humano, que incluye una micromatriz que comprende al menos una sonda de 10 o más nucleótidos de longitud y de una secuencia adecuada para la determinación del genotipo FcγRIIIa de un paciente humano 158. Los ARN o ADN etiquetados se hibridan con sondas complementarias en la matriz y se detectan mediante el escaneo

láser. La intensidad de la hibridación de cada sonda en la matriz se determina y se convierte en un valor cuantitativo que representa los niveles relativos de expresión génica. La selección de las secuencias de la sonda y las longitudes puede ser fácilmente realizadas por un experto en la materia. La secuencia de nucleótidos del gen humano y ARNm que codifica la FcyRIIIa F-158 y alotipos V es conocida. Por lo tanto, la persona experta puede seleccionar sonda(s) que, bajo las condiciones experimentales apropiadas, permiten una determinación del genotipo FcyRIIIa-158 de las secuencias diana.

[0186] Las técnicas para la síntesis de estas matrices usando métodos mecánicos de síntesis se describen en, por ejemplo, La Patente U.S. N° 5.384.261. Aunque una superficie de matriz plana es la preferida, la matriz puede fabricarse en una superficie de prácticamente cualquier forma o incluso una multiplicidad de superficies. Las matrices pueden ser péptidos o ácidos nucleicos en perlas, geles, superficies poliméricas, fibras, tales como fibras ópticas, de vidrio o cualquier otro sustrato apropiado, véase Patentes U.S. N° 5.770.358, 5.789.162, 5.708.153, 6.040.193 y 5.800.992. Las matrices pueden envasarse de tal manera que permitan el diagnóstico u otro tipo de manipulación de un dispositivo de todo incluido. Véase, por ejemplo, Patentes U.S. N° 5.856.174 y 5.922.591.

[0187] Por ejemplo, se describe aquí el kit para su uso en la determinación del genotipo FcyRIIIa-158 de un paciente humano, que incluye oligonucleótidos adecuados para su uso como cebadores en la amplificación catalizada por polimerasa de la región del gen o ARNm que codifica el amino ácido 158 de FcyRIIIa. La selección de secuencias de cebador y las longitudes puede ser fácilmente realizadas por un experto en la materia. La secuencia de nucleótidos del gen humano y ARNm que codifica la FcyRIIIa F-158 y alotipos V es conocida. Por lo tanto, la persona experta puede seleccionar cebadores que, bajo las condiciones experimentales adecuadas, permitan la amplificación de la región del gen o mRNA que codifica el aminoácido 158 de FcyRIIIa. La secuencia amplificada luego se puede secuenciar usando métodos conocidos para determinar el genotipo FcyRIIIa-158 del paciente.

[0188] Otro método para determinar el genotipo FcyRIIIa-158 de un paciente humano es utilizar un método basado en ácido nucleico que detecta la fragmentación del ADN característico del genotipo FcyRIIIa-158 de un paciente humano. Cuando se resuelve utilizando electroforesis en geles de agarosa, el ADN de cada genotipo FcyRIIIa-158 tiene un patrón característico. El presente documento también describe un kit para su uso en la determinación del genotipo FcyRIIIa-158 de un paciente humano, que incluye una o más enzimas de restricción adecuadas para la determinación del genotipo FcyRIIIa-158 de un paciente humano. Las enzimas de restricción adecuadas son conocidos en la técnica (por ejemplo, ver Koene et al. (1997) Blood 90 (3) :1109-1114).

[0189] Los kits descritos en este documento también pueden incluir instrucciones que indican cómo utilizar el kit para determinar el genotipo de un FcyRIIIa-158 paciente humano. El kit también puede incluir, por ejemplo, un agente tampón, un conservante, o un agente estabilizante de proteínas. Cada componente del kit está generalmente encerrado dentro de un recipiente individual y todos los diferentes recipientes están dentro de un solo paquete junto con instrucciones que indican cómo utilizar el kit para determinar el genotipo FcyRIIIa-158 de un paciente humano.

[0190] También se describe en este documento el uso de anticuerpos anti-CD40 en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de un cáncer o condición premaligna asociado con las células que expresan CD40, como se describe en este documento.

[0191] Los anticuerpos anti-CD40 de esta invención se administran en una concentración que es terapéuticamente eficaz para prevenir o tratar un cáncer o condición premaligna asociada con las células que expresan CD40. Para lograr este objetivo, los anticuerpos pueden formularse usando una variedad de portador aceptable y/o excipientes conocidos en la técnica. El anticuerpo anti-CD40 se puede administrar por una vía de administración parenteral. Habitualmente, los anticuerpos se administran por inyección, ya sea por vía intravenosa o subcutánea. Los métodos para realizar esta administración son conocidos por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica.

[0192] La administración intravenosa se produce preferiblemente por infusión durante un período de aproximadamente menos de 1 hora a aproximadamente 10 horas (menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 horas). Infusiones posteriores pueden administrarse durante un período de aproximadamente menos de 1 a aproximadamente 6 horas, incluyendo, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 horas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 horas, o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas o menos de una hora. Alternativamente, una dosis se puede administrar por vía subcutánea.

[0193] Una composición farmacéutica de la divulgación está formulado para ser compatible con su vía de administración prevista. Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o parabenos de metilo; 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 el ajuste de 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 encerrarse en ampollas, jeringas desechables, o viales de dosis múltiples hechas de vidrio o plástico.

[0194] Los anticuerpos anti CD40 se proporcionan típicamente mediante una técnica estándar dentro de un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, estéril salina, agua estéril tamponada, combinaciones de los anteriores, etc. Los métodos para la preparación de agentes administrables por vía parenteral se describen en Remington Pharmaceutical Sciences (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990). Véase también, por ejemplo, WO 98/56418, que describe formulaciones estabilizadas de anticuerpos farmacéuticas adecuadas para uso en los métodos de la presente invención.

[0195] La cantidad de al menos un anticuerpo anti-CD40 a ser administrado se determina fácilmente por un experto ordinario. Los factores que influyen en el modo de administración y la respectiva cantidad de al menos un anticuerpo anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad, la historia de la enfermedad, y la edad, altura, peso, salud, tipo de la enfermedad, así como la condición física del individuo sometido a la terapia o la respuesta a la infusión de anticuerpo. Del mismo modo, la cantidad de anticuerpo anti-CD40 a ser administrada dependerá del modo de administración y de si el sujeto se someterá a una dosis única o dosis múltiples de este agente antitumoral. En general, una mayor dosis de anticuerpo anti-CD40 se prefiere con aumento de peso del sujeto sometido a terapia.

[0196] Para una dosis única de anticuerpo anti-CD40 a administrar en un intervalo de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, des aproximadamente 0,1mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, desde aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, desde aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, desde aproximadamente 5 mg / kg a aproximadamente 15 mg / kg.

[0197] Así, por ejemplo, la dosis puede ser de 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, u otras dosis tales comprendidas en el intervalo de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 50 mg / kg.

[0198] El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Así, en otra realización, el método comprende la administración de dosis múltiples del anticuerpo anti-CD40. El método puede incluir 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 incluya un anticuerpo anti-CD40. La frecuencia y la duración de la administración de dosis múltiples de las composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo anti-CD40 puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica sin experimentación indebida. La misma dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 se puede administrar en el transcurso de un período de tratamiento. Alternativamente, diferentes dosis terapéuticamente eficaces de un anticuerpo anti-CD40 se pueden usar en el transcurso de un período de tratamiento.

[0199] En un ejemplo, un sujeto se trata con anticuerpo anti-CD40 en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, una vez por semana durante aproximadamente 1 a 10 semanas, preferiblemente alrededor de 2 a 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente de 3 a 7 semanas, y aún más preferiblemente aproximadamente 4, 5, o 6 semanas. El tratamiento puede producirse a intervalos de 2 a 12 meses para prevenir la recaída o tras la indicación de la recaída. También se apreciará que la dosis efectiva de anticuerpo utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el curso de un tratamiento particular. Los cambios en la dosis pueden resultar y ser evidentes a partir de los resultados de los ensayos de diagnóstico como se describe en el presente documento.

[0200] Así, en una realización, el régimen de dosificación incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 en los días 1, 8, 15, y 22 de un período de tratamiento.

[0201] En otra realización, el régimen de dosificación incluye un régimen de dosificación que tiene una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 diario o en los días 1, 3, 5, y 7 de una semana en un período de tratamiento; un régimen de dosificación que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 en los días 1 y 3-4 de una semana en un período de tratamiento, y un régimen de dosificación preferida que incluye una primera administración de una dosis terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-CD40 en el día 1 de una semana en un período de tratamiento. El período de tratamiento puede comprender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, un mes, dos meses, tres meses, seis meses o un año. Los períodos de tratamiento puede ser posteriores o estar separados unos de otros por una semana, 2 semanas, un mes, 3 meses, 6 meses, o un año.

[0202] En otras realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte en este documento puede estar en el intervalo de dosificación inferior (es decir, de alrededor de 0,3 mg/kg

a aproximadamente 20 mg/kg) con dosis posteriores que están dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg).

[0203] En realizaciones alternativas, la dosis terapéuticamente eficaz inicial de un anticuerpo anti-CD40 como se define en otra parte en este documento puede estar en el intervalo de dosificación superior (es decir, de alrededor de 20 mg / kg a aproximadamente 50 mg/kg) con dosis posteriores dentro del intervalo de dosificación inferior (es decir, 0,3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg). Así, en algunas realizaciones, la terapia de anticuerpos anti-CD40 puede iniciarse por la administración de una "dosis de carga" del anticuerpo al sujeto en necesidad de tratamiento. Por "dosis de carga" se entiende una dosis inicial del anticuerpo anti-CD40 que se administra al sujeto, donde la dosis del anticuerpo administrado está dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg). La "dosis de carga" puede administrarse como una única administración, por ejemplo, una infusión única en la que se administra el anticuerpo IV, o como administraciones múltiples, por ejemplo, infusiones múltiples en las que se administra el anticuerpo IV, siempre que la "dosis de carga" completa se administre dentro de un período de aproximadamente 24 horas. Después de la administración de la "dosis de carga", al sujeto se le administra a continuación una o más dosis adicionales terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti-CD40. Se pueden administrar subsiguientes dosis terapéuticamente eficaces, por ejemplo, de acuerdo con un programa de dosificación semanal, o una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas. En tales realizaciones, las dosis terapéuticamente eficaces posteriores generalmente están comprendidas en el intervalo de dosificación inferior (es decir, 0,3 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg).

[0204] Alternativamente, en algunas formas de realización, tras la "dosis de carga", las posteriores dosis terapéuticamente eficaces del anticuerpo anti-CD40 se administran según un "programa de mantenimiento", en el que la dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo 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 realizaciones, las dosis terapéuticamente eficaces de los anticuerpos anti-CD40 están dentro del intervalo de dosificación inferior (es decir, 0,003 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg), especialmente cuando las dosis posteriores se administran en intervalos más frecuentes, por ejemplo, una vez cada dos semanas a una vez al mes, o dentro del intervalo de dosificación superior (es decir, desde aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg), especialmente cuando las dosis posteriores se administran en intervalos menos frecuentes, por ejemplo, cuando las dosis posteriores se administran con de aproximadamente un mes a aproximadamente 12 meses de diferencia.

[0205] Los anticuerpos anti-CD40 presentes en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria para su uso en los métodos de la invención pueden ser nativos u obtenerse mediante técnicas recombinantes, y puede venir de cualquier fuente, incluidas las fuentes de mamíferos tales como, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo, primate y humano. Preferiblemente, tales polipéptidos se obtienen de una fuente humana, y más preferiblemente son proteínas recombinantes humanas, a partir de líneas celulares de hibridoma.

[0206] Las composiciones farmacéuticas útiles en los métodos de la invención pueden incluir variantes biológicamente activas de los antagonistas de anticuerpos anti-CD40 de la invención, tal como se describe en este documento.

[0207] Cualquier composición farmacéutica que incluye un anticuerpo anti-CD40 que tenga las propiedades de unión descritas en el presente documento conforme a las cuales el componente terapéuticamente activo puede usarse en los métodos de la invención. Así composiciones líquidas, liofilizadas, o secadas por pulverización que comprenden uno o más de los anticuerpos anti-CD40 se pueden preparar como una solución acuosa o no acuosa o suspensión para la administración posterior a un sujeto de acuerdo con los métodos de la invención. Cada una de estas composiciones incluyen al menos un anticuerpo anti-CD40 como un componente terapéuticamente o profilácticamente activo. Por "componente terapéuticamente o profilácticamente activo" se entiende que el anticuerpo anti-CD40 está específicamente incorporado en la composición para provocar una respuesta terapéutica o profiláctica deseada con respecto al tratamiento, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad o afección en un sujeto cuando la composición farmacéutica se administra a ese sujeto. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas incluyen agentes estabilizantes apropiados, agentes de carga, o ambos para reducir al mínimo los problemas asociados con la pérdida de estabilidad de la proteína y la actividad biológica durante la preparación y el almacenamiento.

[0208] Se pueden añadir adyuvantes a las composiciones farmacéuticas que incluyen un anticuerpo anti-CD40 de la invención. Estos adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a, aceites, polímeros, vitaminas, carbohidratos, aminoácidos, sales, tampones, albúmina, tensioactivos o agentes de carga. Preferiblemente los carbohidratos incluyen azúcar 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, y una ciclodextrina p, almidón soluble, almidón hidroxietil y carboximetilcelulosa, o mezclas de los mismos. El "Alcohol de azúcar" se define como un hidrocarburo C₄ a C₈ que tiene un grupo hidroxilo e incluye galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol, y arabitol. Estos azúcares o alcoholes de azúcar pueden utilizarse

individualmente o en combinación. La concentración de azúcar o alcohol de azúcar está entre 1,0% y 7% w/v, más preferiblemente entre 2,0% y 6,0% w/v. Preferiblemente, los aminoácidos incluyen levógiro (L) formas de carnitina, arginina, y betaina; sin embargo, se pueden añadir otros aminoácidos. Los polímeros preferidos incluyen polivinilpirrolidona (PVP) con un peso molecular medio entre 2.000 y 3.000, o polietilenglicol (PEG) con un peso molecular medio entre 3.000 y 5.000. Los tensioactivos que pueden añadirse a la formulación se muestran en las EP N° 270.799 y 268.110.

[0209] Además, los anticuerpos pueden modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para aumentar su vida media en circulación, por ejemplo. Los polímeros preferidos, y los métodos para unirlos a péptidos, se muestran en las Patentes U.S. N° 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; Y 4.609.546. Los polímeros preferidos son polioles polioxietylados y polietilenglicol (PEG). El PEG es soluble en agua a temperatura ambiente y tiene la fórmula general: $R(O-CH_2-CH_2)_nOR$ en el que R puede ser hidrógeno, o un grupo protector tal como un grupo alquilo o alcohol. Preferiblemente, el grupo protector tiene entre 1 y 8 átomos de carbono, más preferiblemente es metilo. El símbolo n es un entero positivo, preferiblemente entre 1 y 1.000 y más preferiblemente entre 2 y 500. El PEG preferido tiene un peso molecular medio de entre 1.000 y 40.000, más preferiblemente entre 2.000 y 20.000 y aún más preferiblemente entre 3.000 y 12.000. Preferiblemente, el PEG tiene al menos un grupo hidroxilo, más preferiblemente es un grupo hidroxilo terminal. Este es el grupo hidroxilo que se activa preferiblemente para reaccionar con un grupo amino libre en el inhibidor. Sin embargo, se entenderá que el tipo y cantidad de los grupos reactivos pueden modificarse para obtener un PEG/anticuerpo conjugado de manera covalente de la presente invención.

[0210] Los polioles polioxietylados solubles en agua también son útiles en la presente invención. Ellos incluyen sorbitol polioxietylado, glucosa polioxietylada, glicerol polioxietylado (POG), y similares. El POG es preferible. Una razón es debido a que el esqueleto de glicerol de glicerol polioxietylado es el mismo esqueleto que ocurre de manera natural en, por ejemplo, animales y seres humanos en los mono-, di-, y triglicéridos. Por lo tanto, esta ramificación no se vería necesariamente como un agente extraño en el cuerpo. El POG tiene un peso molecular preferido en el mismo intervalo que PEG. La estructura para POG se muestra en la Knauf et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, Y una discusión de los POG/IL-2 conjugados se encuentra en la Patente U.S. No. 4.766.106.

[0211] Otro sistema de administración de fármacos para circulatorio aumentar la vida media es el liposoma. Los métodos de preparación de los sistemas de entrega de liposomas se discuten en Gabizon et al (1982) Investigación del Cáncer 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; Y Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Ing. 9:467. Otros sistemas de suministro de fármacos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Poznansky et al. (1980) Sistemas de suministro de fármacos (RL Juliano, ed., Oxford, NY) pp 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs. 36:277.

[0212] Los adyuvantes que han de incorporarse en una composición farmacéutica deberían proporcionar la estabilidad del anticuerpo anti-CD40. Es decir, el anticuerpo anti-CD40 debe conservar su estabilidad física y/o química y tener la actividad biológica deseada, es decir, una o más de las actividades antagonistas definidas anteriormente en este documento, incluyendo, pero sin limitarse a, la inhibición de la secreción de inmunoglobulinas por células B humanas normales periféricas estimuladas por células T; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B humanas normales periféricas estimuladas por células T Jurkat; inhibición de la supervivencia y/o proliferación de células B humanas normales periféricas estimuladas por células que expresan CD40L o ligando soluble CD40 (sCD40L); inhibición de señales intracelulares anti-apoptóticas 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, y la inhibición de la proliferación de las células B humanas malignas como se señaló en otra parte de la presente memoria.

[0213] Los métodos para el control de la estabilidad de la proteína son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90; Lee, ed. (1991) Administración de Fármacos Péptidos y Proteínas (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York), y los ensayos de estabilidad descritos a continuación en este documento. En general, la estabilidad de proteínas se mide a una temperatura elegida durante un período específico de tiempo. En realizaciones preferidas, una formulación farmacéutica de anticuerpo estable proporciona la estabilidad del anticuerpo anti-CD40 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 en torno a 2-8 °C durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses o al menos 24 meses.

[0214] Una proteína tal como un anticuerpo, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que conserva su estabilidad física en un punto dado en el tiempo si no muestra signos visuales (es decir, decoloración o pérdida de claridad) o señales medibles (por ejemplo, utilizando cromatografía de exclusión molecular (SEC) o dispersión de luz UV) de precipitación, agregación, y/o desnaturalización en ese compuesto farmacéutico. 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 punto dado en el tiempo si las mediciones de estabilidad química son indicativas de que la proteína (es decir, el anticuerpo) mantiene la actividad biológica de interés en ese compuesto farmacéutico. Los métodos para el control de los cambios en la estabilidad química son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, los métodos para detectar formas químicamente alteradas de la proteína tales como el resultado de recortes, usando, por ejemplo, SDS-PAGE, SEC, y/o desorción

de láser asistido por matriz de ionización/tiempo de espectrometría de masa de vuelo y la degradación asociada con cambios en la carga molecular (por ejemplo, asociada con desamidación), usando, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico. Véanse, por ejemplo, los métodos descritos aquí a continuación.

[0215] Un anticuerpo anti-CD40, cuando se formula en una composición farmacéutica, se considera que conserva una actividad biológica deseada en un punto dado en el tiempo si la actividad biológica deseada en ese momento está dentro de aproximadamente 30%, preferiblemente dentro de aproximadamente 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 anti-CD40 pueden realizarse como se describe en los Ejemplos de este documento. Véase también los ensayos descritos en Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 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) Protocolos Actuales en Inmunología 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) 79:439-444 Inmunología; y Patentes U.S. N° 5.674.492 y 5.847.082.

[0216] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se formula en una formulación farmacéutica líquida. El anticuerpo anti-CD40 se puede preparar usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo aquellos procedimientos descritos en este documento anteriormente. En una realización, el anticuerpo anti-CD40 se produce de manera recombinante en una línea celular CHO.

[0217] Cuando el anticuerpo anti-CD40 se almacena antes de su formulación, pueden congelarse, por ejemplo, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, y después se descongeló a temperatura ambiente para formulación adicional. La formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40. La cantidad de anticuerpo del mismo presente en la formulación tiene en consideración la vía de administración y dosis de volumen deseado.

[0218] De esta manera, la composición farmacéutica líquida incluye el anticuerpo anti-CD40 a 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 a 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 de aproximadamente 15,0 mg/ml hasta aproximadamente 25,0 mg/ml. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica líquida incluye el anticuerpo anti-CD40 a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 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 incluye el anticuerpo anti-CD40 a una concentración de aproximadamente 15,0 mg/ml, aproximadamente 16,0 mg/ml, aproximadamente 17,0 mg/ml, aproximadamente 18,0 mg/ml, aproximadamente 19,0 mg/ml, aproximadamente 20,0 mg/ml, aproximadamente 21,0 mg/ml, aproximadamente 22,0 mg/ml, aproximadamente 23,0 mg/ml, aproximadamente 24,0 mg/ml, o aproximadamente 25,0 mg/ml. La composición farmacéutica líquida incluye el anticuerpo anti-CD40 y un tampón que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, incluyendo aproximadamente pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, y otros valores tales dentro del intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0. En algunas realizaciones, el tampón mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 a 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 a aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5, o aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,0.

[0219] Cualquier tampón adecuado que mantenga el pH de la formulación líquida de anticuerpos anti-CD40 en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 7,0 puede ser utilizado en la formulación, siempre que la estabilidad fisicoquímica y la actividad biológica deseada del anticuerpo se conserven como se señaló anteriormente en el presente documento. Los tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos convencionales y sus sales, donde el contraión puede ser, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, o magnesio. Ejemplos de ácidos convencionales y sus sales que se pueden usar para amortiguar la formulación farmacéutica líquida incluyen, pero no se limitan a, 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 de tampón en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, incluyendo aproximadamente 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, u otros valores tales dentro del intervalo de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón en la formulación va desde aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, incluyendo aproximadamente 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, u otros valores tales dentro del intervalo de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM.

[0220] En algunas realizaciones de la invención, la formulación farmacéutica líquida incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 y tampón succinato o tampón citrato a una concentración que mantiene el pH de la formulación en el intervalo de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, preferiblemente de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,5. Por "tampón succinato" o "tampón citrato" se entiende un tampón que incluye una sal de ácido succínico o una sal de ácido cítrico, respectivamente. En una realización preferida, el contraión de succinato o citrato es el catión sodio y, por consiguiente el tampón es succinato de sodio o citrato de sodio, respectivamente. Sin embargo, se espera que cualquier catión sea eficaz. Otro posible succinato o citrato de cationes incluyen, pero no se limitan a, potasio, amonio, calcio, y magnesio. Como se señaló anteriormente, la concentración de tampón succinato o citrato en la formulación puede ser desde aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm, incluyendo aproximadamente 1 mm, 2 mm, 5 mm, 8 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 25, 30 mm, 35 mm, 40 mm, 45 mm, 50 mm, u otros valores tales dentro del intervalo de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 50 mm. En algunas realizaciones, la concentración del tampón en la formulación es desde aproximadamente 5 mm a aproximadamente 15 mm, incluyendo aproximadamente 5 mm, 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm, 10 mm, 11 mm, 12 mm, 13 mm, 14 mm, o aproximadamente 15 mm. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida comprende el anticuerpo anti-CD40 a 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 de succinato de sodio o citrato de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 mm a aproximadamente 20 mm, aproximadamente 5 mm a aproximadamente 15 mm, y preferiblemente de aproximadamente 10 mm.

[0221] Cuando sea deseable para la formulación farmacéutica líquida estar próxima a la forma isotónica, la formulación farmacéutica líquida que incluye el anticuerpo anti-CD40 y un tampón puede incluir además una cantidad de un agente de isotonicidad suficiente para hacer la formulación cercana a la forma isotónica. Por "cercana a la forma isotónica" se entiende la formulación acuosa que tiene una osmolaridad de aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 360 mmol/kg, preferiblemente de aproximadamente 240 a aproximadamente 340 mmol/kg, más preferiblemente de aproximadamente 250 a aproximadamente 330 mmol/kg, incluso más preferiblemente aproximadamente 260 a aproximadamente 320 mmol/kg y aún más preferiblemente de aproximadamente 270 a aproximadamente 310 mmol/kg. Los métodos 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.

[0222] Los expertos en la técnica están familiarizados con una variedad de solutos farmacéuticamente aceptables útiles para proporcionar isotonicidad en 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 a un valor casi igual a la de un fluido corporal. Es deseable utilizar un agente de isotonicidad fisiológicamente aceptable. Así, la formulación farmacéutica líquida que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40 y un tampón puede incluir además componentes que pueden ser usados para proporcionar isotonicidad, por ejemplo, cloruro de sodio, aminoácidos tales como alanina, valina y glicina; azúcares y alcoholes de azúcares (polioles), incluyendo, pero si limitarse a, glucosa, dextrosa, fructosa, sacarosa, maltosa, manitol, trehalosa, glicerol, sorbitol y xilitol, ácido acético, otros ácidos orgánicos o sus sales, y cantidades relativamente menores de citratos o fosfatos. La persona experta ordinaria sabría que agentes adicionales son adecuados para proporcionar la tonicidad óptima de la formulación líquida.

[0223] En algunas realizaciones preferidas, la formulación farmacéutica líquida que incluye un anticuerpo anti-CD40 y un tampón incluye además cloruro de sodio como agente de isotonicidad. La concentración de cloruro de sodio en la formulación dependerá de la contribución de otros componentes a la tonicidad. En algunas realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 50 mm a aproximadamente 300 mm, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mm, aproximadamente 50 mm a aproximadamente 200 mm, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 175 mm, aproximadamente 50 mm a aproximadamente 150 mm, aproximadamente 75 mm a aproximadamente 175 mm, aproximadamente 75 mm a aproximadamente 150 mm, aproximadamente 100 mm a aproximadamente 175 mm, aproximadamente 100 mm a aproximadamente 200 mm, aproximadamente 100 mm a aproximadamente 150 mm, aproximadamente 125 mm a aproximadamente 175 mm, aproximadamente 125 mm a aproximadamente 150 mm, aproximadamente 130 mm a aproximadamente 170 mm, aproximadamente 130 mm a aproximadamente 160 mm, aproximadamente 135 mm a aproximadamente 155 mm, aproximadamente 140 mm a aproximadamente 155 mm, o aproximadamente 145 mm a aproximadamente 155 mm. En una de tales realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 150 mm. En otras de dichas realizaciones, la concentración de cloruro de sodio es de aproximadamente 150 mm, el tampón es succinato de sodio o tampón de citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 5 mm a aproximadamente 15 mm, la formulación farmacéutica líquida comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, y la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 a aproximadamente pH 6,5. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida incluye el anticuerpo anti-CD40 a 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 sódico, y aproximadamente 10 mm de succinato de sodio o citrato de sodio, a un pH de aproximadamente pH 5,5.

[0224] La degradación de proteínas debido a la congelación-descongelación o cizallamiento mecánico durante el procesamiento de una formulación farmacéutica líquidas de la presente invención se puede inhibir mediante la incorporación de agentes tensioactivos en la formulación con el fin de disminuir la tensión superficial en la interface disolución-aire. Así, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, un tampón, e incluye además un tensioactivo. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida incluye un anticuerpo anti-CD40, un tampón, un agente isotónico, e incluye además un tensioactivo.

[0225] Los tensioactivos típicos empleados son tensioactivos no iónicos, incluidos ésteres de sorbitol de polioxietileno 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-pt-octilfenol tal como Triton X-100. La estabilización clásica de productos farmacéuticos mediante tensioactivos o emulsionantes se describe, por ejemplo, en Levine *et al.* (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45 (3):160-165. Un tensioactivo preferido empleado en la práctica de la presente invención es polisorbato 80. Cuando un tensioactivo está incluido, se añade típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1,0% (w/v), aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 0,5%, aproximadamente 0,03% a aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5%, o de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,2%.

[0226] Así, en algunas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-CD40, el tampón es succinato de sodio o tampón de citrato de sodio a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, la formulación tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 hasta aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5,5 hasta aproximadamente pH 6,5, y la formulación incluye además un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1,0% o aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%. Tales formulaciones pueden incluir opcionalmente un agente isotónico, tal como cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, o aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. En otras realizaciones, la formulación farmacéutica líquida incluye el anticuerpo anti-CD40 a 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; alrededor de 50 mM a aproximadamente 200 mM de cloruro sódico, incluyendo aproximadamente 150 mM de cloruro sódico; succinato de sodio o citrato de sodio de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, incluyendo aproximadamente 10 mM de succinato de sodio o citrato de sodio, cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, incluyendo aproximadamente 150 mM, y opcionalmente un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80, en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 1,0%, incluyendo aproximadamente 0,001% a aproximadamente 0,5%; donde la formulación farmacéutica líquida tiene un pH de aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 5,0 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 a aproximadamente pH 6,0.

[0227] La formulación farmacéutica líquida puede estar esencialmente libre de conservantes y otros portadores, excipientes, o estabilizadores señalados anteriormente en este documento. Alternativamente, la formulación puede incluir uno o más conservantes, por ejemplo, agentes antibacterianos, vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores descritos aquí anteriormente, siempre que no afecten negativamente a la estabilidad fisicoquímica del anticuerpo anti-CD40. Ejemplos de vehículos aceptables, excipientes y estabilizadores incluyen, pero no se limitan a, agentes tamponantes adicionales, co-disolventes, tensioactivos, antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y metionina, agentes quelantes tales como EDTA, complejos de metales (por ejemplo, proteína Zn), y polímeros biodegradables tales como poliésteres. Una discusión detallada de formulación y selección de vehículos farmacéuticamente aceptables, estabilizadores, y isomolitos se puede encontrar en Remington Pharmaceutical Sciences (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

[0228] "Portadores" como se usa en la presente memoria incluyen portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizadores que son no tóxicos para la célula o mamífero expuesto a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico; bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos) polipéptidos, 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 incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas, agentes

quelantes tales como EDTA, alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formados por sales, tales como sodio, y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG), y Pluronic.

5 **[0229]** La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

10 **[0230]** Después de la formulación farmacéutica líquida u otro compuesto farmacéutico descrito en este documento se prepare, se pueden liofilizar para evitar la degradación. Los métodos para liofilizar composiciones líquidas son conocidos por los de experiencia ordinaria en la técnica. Justo antes de usarla, la composición puede reconstituirse con un diluyente estéril (solución de Ringer, agua destilada, o solución salina estéril, por ejemplo) que puede incluir ingredientes adicionales. Tras la reconstitución, la composición se administra de preferencia a los sujetos usando los métodos que son conocidos por los expertos en la técnica.

15 **[0231]** En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-CD40 se pueden administrar en combinación con al menos una terapia del cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cirugía, terapia de radiación, quimioterapia, terapia de citoquinas, o anticuerpo monoclonal para uso en el tratamiento del tumor sólido de interés, en el que se administra la terapia contra el cáncer adicional antes de, durante, o después de la terapia con anticuerpos anti-CD40. Así pues, cuando las terapias combinadas incluyen la administración de un anticuerpo anti-CD40 en combinación con la administración de otro agente terapéutico, como con quimioterapia, terapia de citoquinas, u otro anticuerpo monoclonal, los métodos de la invención abarcan la coadministración, usando formulaciones separadas o una sola formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo donde ambos agentes activos (o todos) ejercen simultáneamente sus actividades terapéuticas. Cuando los métodos de la descripción incluyen regímenes terapéuticos combinados, estas terapias pueden darse simultáneamente, es decir, el anticuerpo anti-CD40 se administra concurrentemente o dentro del mismo marco de tiempo que la otra terapia contra el cáncer (es decir, las terapias tienen lugar al mismo tiempo, pero el anticuerpo anti-CD40 no se administra precisamente a la misma vez que la otra terapia contra el cáncer). Alternativamente, el anticuerpo anti-CD40 de la presente invención también se pueden administrar antes de o después que la otra terapia de cáncer. La administración secuencial de las diferentes terapias contra el cáncer puede realizarse independientemente de que el sujeto tratado responda al primer curso de terapia para disminuir la posibilidad de remisión o recaída. Cuando las terapias combinadas incluyen la administración del anticuerpo anti-CD40 en combinación con la administración de un agente citotóxico, se administra preferiblemente el anti-CD40 antes de la administración del agente citotóxico.

35 **[0232]** De esta manera, los anticuerpos anti-CD40 se administran en combinación con al menos una terapia del cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, los procedimientos de cirugía o quirúrgica (por ejemplo, esplenectomía, hepatectomía, linfadenectomía, leucoforesis, trasplante de médula ósea, y similares) ; terapia de radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, donde los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fludarabina o fosfato de fludarabina, clorambucilo, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona , y combinaciones de los mismos, por ejemplo, regímenes que contienen antraciclina tales como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona y doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina y dexametasona), MP (melfalán más prednisona) , y otros agentes citotóxicos y / o terapéuticos usados en quimioterapia tales como mitoxantrona, antimetabolitos daunorubicina, idarubicina, asparaginasa, e incluyendo, pero sin limitarse a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracilo decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, y nelarabina; otra terapia contra el cáncer de anticuerpo monoclonal (por ejemplo, alemtuzumab (Campath®) u otro anticuerpo anti-CD52 dirigido al CD52 de la superficie celular glicoproteína en células B malignas; rituximab (Rituxan®), El anticuerpo totalmente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/1-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), o cualquier otro anti-CD20 terapéutico dirigido al antígeno CD20 en células B malignas; anticuerpo anti-CD 19 (por ejemplo, MT103, un anticuerpo biespecífico); anticuerpo anti-CD22 (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humanizado epratuzumab); contra bevacizumab (Avastin®) u otros anticuerpos anti-cáncer dirigidos al factor de crecimiento endotelial vascular humano; anticuerpo anti-CD22 dirigido al antígeno CD22 en células B malignas (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal BL-22, una toxina alphaCD22); anticuerpo α-M-CSF dirigido a factor estimulante de colonias de macrófagos; anticuerpos dirigidos al receptor activador del factor nuclear kappaB (RANK) y su ligando (RANKL), que se sobreexpresan en el mieloma múltiple; anticuerpo anti-CD23 dirigido al antígeno CD23 en células B malignas (por ejemplo, IDEC-152); anti-anticuerpo CD80 dirigido al antígeno CD80 (por ejemplo, IDEC-114); anticuerpo anti-CD38 dirigido al antígeno CD38 en células B malignas; anticuerpos dirigidos al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (receptores de anti-anticuerpos MHC) expresados en células B malignas; contra otros anticuerpos CD40 (por ejemplo, SGN-40) dirigidos al antígeno CD40 en células B malignas, y anticuerpos dirigidos a la necrosis tumoral relacionados con el factor de inducción de apoptosis-ligando del receptor 1 (TRAIL-R1) (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal agonista humano HGS- ETR1) y TRAIL-R2 expresado en una serie de tumores sólidos y tumores de origen hematopoyético); terapia del cáncer basada en pequeñas moléculas, incluyendo, pero sin limitarse a, inhibidores de microtúbulos y/o topoisomerasa (por ejemplo, el inhibidor mitótico dolastatina y análogos de dolastatina, el agente de unión a tubulina T900607; XL 119, y el inhibidor de la topoisomerasa aminocamptotecina), SDX-105 (clorhidrato de bendamustina), ixabepilona (un análogo de epotilona, también conocido como BMS-247550), inhibidores de proteína cinasa C, por ejemplo, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoilestaurosporina), pixantrona, eloxatin (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), segunda generación análoga de nucleósidos de purina, tales como clofarabina, inhibidores de la producción de la proteína Bcl-2 por células cancerosas (por ejemplo, la molécula antisentido de agentes oblimersen y Genasense®), inhibidores de proteasoma (por ejemplo, Velcade™ (bortezomib)), inhibidores de quinasa de moléculas pequeñas (por ejemplo, CHIR-258), inhibidores de VEGF de molécula pequeña (por ejemplo, ZD-6474), inhibidores de moléculas pequeñas de proteína de choque térmico (HSP) 90 (por ejemplo, 17-AAG), inhibidores de moléculas pequeñas de las histonas desacetilasas (por ejemplo, citodiferenciación híbrida/polar HPC) agentes tales como ácido suberanilohidroxámico (SAHA), y FR-901228) y agentes apoptóticos tales como Trisenox® (Trióxido de arsénico) y Xcytrin® (Motexafin gadolinio); vacunas/inmunoterapia basada en terapias contra el cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, enfoques de vacunas (por ejemplo, Id-KLH, Oncophage, vitaethine), inmunoterapia personalizada o inmunoterapia activa de idiotipo (por ejemplo, inmunoterapia personalizada MyVax®, formalmente designada GTOp-99), Promune® (CpG 7909, un agonista sintético de los receptores tipo toll 9 (TLR9)), la terapia con interferón-alfa, terapia interleucina-2 (IL-2), terapia de IL-12, terapia de IL-15, y terapia de IL-21; terapia con esteroides, u otra terapia de cáncer; donde se administra la terapia contra el cáncer adicional antes de, durante, o después de la terapia con anticuerpos antagonistas anti-CD40.

[0233] En una realización, los anticuerpos anti-CD40 se administran en combinación con bortezomib (VELCADE®), En particular para el tratamiento del mieloma múltiple. WO 2005/044855 A2 da a conocer que el tratamiento de combinación de CHIR-12.12 con bortezomib aumenta la eficacia de la inhibición del crecimiento tumoral en modelos experimentales de mieloma múltiple.

[0234] En una realización, los anticuerpos anti-CD40 se administran en combinación con IL-2, en particular para el tratamiento del linfoma de células B. WO 2005/044294 A2 da a conocer que la combinación de CHR-12.12 con IL-2 en el tratamiento resultó en actividad anti-tumor aditiva contra tumores Namalwa.

[0235] Se describe aquí el uso de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer o condición premaligna que está asociada con las células que expresan CD40 en un paciente humano heterocigoto u homocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), en donde el medicamento está coordinado con el tratamiento de al menos otra terapia del cáncer.

[0236] Por "coordinado" se entiende el medicamento que incluye el anticuerpo anti-CD40 para ser utilizado ya sea antes, durante, o después del tratamiento del sujeto con al menos otra terapia del cáncer.

[0237] También se describe en la presente memoria el uso de un anticuerpo anti-CD40 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente humano para un cáncer o condición premaligna que está asociada con las células que expresan CD40, en el que dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa - 158F (genotipo V/F o F/F) y se ha pretratado con al menos otro agente oncotérapéutico.

[0238] Por "pretratado" o "tratamiento previo" se entiende que el sujeto ha recibido una o más terapias contra el cáncer (es decir, ha sido tratados con al menos otra terapia contra el cáncer) antes de recibir el medicamento que incluye el anticuerpo anti-CD40. "Pretratado" o "pre-tratamiento" incluye sujetos que han sido tratados con al menos una terapia de otro tipo de cáncer en un plazo de 2 años, 18 meses, 1 año, 6 meses, 2 meses, 6 semanas, 1 mes, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, o 1 día antes del inicio del tratamiento con el medicamento que incluye el anticuerpo anti-CD40. No es necesario que el sujeto responda al tratamiento previo con la terapia o terapias anteriores contra el cáncer. Así, el sujeto que recibe el medicamento que incluye el antagonista del anticuerpo anti-CD40 podría haber respondido, o podría no haber respondido (es decir el cáncer era refractario), al tratamiento previo con la anterior terapia contra el cáncer, o a uno o más de las terapias contra el cáncer anteriores donde el pretratamiento incluía múltiples terapias contra el cáncer. Los ejemplos de terapias contra el cáncer para las que un sujeto puede haber recibido tratamiento previo antes de recibir el medicamento que incluye el anticuerpo anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, cirugía, terapia de radiación; quimioterapia, opcionalmente en combinación con trasplante autólogo de médula ósea, donde los agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos aquí y en WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294; Otra terapia contra el cáncer de anticuerpo monoclonal, incluyendo, pero sin limitarse a, los anticuerpos anti-cáncer que se describen en la presente memoria y en WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, y WO 2005/044294; la terapia del cáncer basada en moléculas pequeñas, incluyendo, pero sin limitarse a, las moléculas pequeñas que se describen en la presente memoria y en WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, y WO 2005/044294; vacunas/inmunoterapia basadas en terapias contra el cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, las descritas aquí y en WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294; terapia de esteroides; otra terapia contra el cáncer, o cualquier combinación de los mismos.

[0239] "Tratamiento", en el contexto de uso coordinado de un anticuerpo anti-CD40 con una o más terapias contra el cáncer, se define aquí como la aplicación o administración del anticuerpo anti-CD40 o la terapia del cáncer para un paciente, o la aplicación o administración a un tejido aislado o línea celular de un paciente, donde el paciente tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, donde el propósito es curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, o afectar a la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. Por "tratamiento" también se entiende la aplicación o administración de un compuesto farmacéutico que incluye el anticuerpo anti-CD40 o la terapia de cáncer para un paciente, o la aplicación o administración de una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo anti-CD40 u otra terapia contra el cáncer a un tejido aislado o línea celular de un paciente, que tiene una enfermedad, un síntoma de una enfermedad, o una predisposición hacia una enfermedad, donde el propósito es curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, aliviar, mejorar, o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad.

[0240] En algunas realizaciones, la terapia de combinación proporciona una mejora sinérgica de la eficacia terapéutica con respecto a los agentes terapéuticos individuales cuando se administran solos. El término "sinergia" se utiliza 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 resulta en "inhibición sinérgica" de una actividad o proceso, por ejemplo, el crecimiento del tumor, se entiende que la inhibición de la actividad o proceso es mayor que la suma de los efectos inhibidores de cada agente activo respectivo. El término "efecto terapéutico sinérgico" se refiere a un efecto terapéutico observado con una combinación de dos o más terapias en el que el efecto terapéutico (medido por cualquiera de un número de parámetros) es mayor que la suma de los efectos individuales terapéuticos observados con las terapias individuales respectivas.

[0241] Varios aspectos y realizaciones de la presente invención se describirán ahora en más detalle a modo de ejemplo únicamente. Se apreciará que la modificación de detalle se puede hacer sin apartarse del alcance de la invención.

EXPERIMENTAL

[0242] El anticuerpo anti-CD40 usado en los ejemplos siguientes es CHIR-12.12. La producción, secuenciación y caracterización del anticuerpo CHIR-12.12 se describe en detalle en las solicitudes de patente internacional publicadas como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, Y WO 2005/044294. La línea de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC # 12056) que expresa el anticuerpo CHIR-12.12 se ha depositado en la American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2.209 (EE.UU.).] Con el número de depósito de patente PTA-5543.

Ejemplo 1: Análisis de ADCC en líneas celulares

[0243] CHIR-12.12 y rituximab se compararon por su actividad relativa ADCC contra una variedad de líneas malignas de células B que expresan tanto antígenos de CD40 y CD20, incluyendo líneas celulares de linfoma (Daudi, Namalwa), múltiples líneas celulares de mieloma (ARH77, IM-9), una línea celular B-ALL (CCPR-SB), y una línea celular B-CLL (EHEB).

[0244] La eficacia de ADCC y la potencia medida como el porcentaje de lisis máxima y ED50, respectivamente, se compararon para CHIR-12.12 y rituximab. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 1A-1F. Para todas las líneas de células diana, CHIR-12.12 es un mediador más potente y eficaz de ADCC que rituximab. En las seis líneas celulares ensayadas, el número de moléculas CD20 de superficie celular por célula fue de 2,6 a 30,8 veces mayor que de CD40. Estos datos muestran que a pesar de mostrar un menor número de moléculas de CD40 que de CD20, las líneas de células malignas B están más eficazmente lisadas por CHIR-12.12 que rituximab.

Ejemplo 2: Análisis de ADCC en células CLL de pacientes

[0245] La actividad relativa a ADCC de CHIR-12.12 y rituximab contra células CLL primarias *ex vivo* de 8 pacientes se comparó. CHIR-12.12 exhibió una mayor ADCC de rituximab contra la CLL de todos los pacientes (véase la Figura 2A-D y Figura 3). El porcentaje de lisis media máxima por CHIR-12.12 y rituximab fueron de $49 \pm 16\%$ y $31 \pm 14\%$, respectivamente. CHIR-12.12 es mas de 10 veces más potente que rituximab, medido por valores ED₅₀ (14,1 pm frente a 155,5 pm, respectivamente).

Experimento de Diseño de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (ADCC)

[0246] Células diana: Células CLL del paciente, 5000/pocillo. Células efectoras: células humanas normales NK purificadas, 50.000/pocillo. E:T ratio: 10. Concentración Abs: 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 µg/ml. Tiempo de incubación: 4 horas. Medio de cultivo: RPMI (w/o rojo de fenol) + 10% FBS + 1% P/S. Dispositivo de Cultivo: placa de fondo redondo de 96 pocillos. Lectura: liberación de calceína AM medida por unidades arbitrarias de fluorescencia (AFU) con 485nm de excitación /535 nm de emisión. Cálculo: % de lisis específica = $100 \times (\text{prueba AFU} - \text{liberación espontánea 1 AFU}) / (\text{máxima liberación 2 AFU} - \text{AFU espontáneo})$. Control negativo: calceína liberada

por las células diana en ausencia de anticuerpo o células NK. Control positivo: calceína liberada por las células diana a la lisis por detergente (1% NP40).

[0247] Los resultados ilustrados en las Figuras 2 y 3 muestran que CHIR-12.12 media mayor ADCC que rituximab contra las células de pacientes con CLL. La magnitud de la diferencia de ADCC puede depender de cualquiera de las células diana o las células NK del donante, pero se observó contra todas las muestras de pacientes. Cuando las células CLL de un solo paciente se ensayaron con dos células NK donantes diferentes, CHIR-12.12 mediadas mayor ADCC de rituximab para ambas células NK donantes, aunque la magnitud de la ADCC diferencial no fue idéntica (véase la Figura 4). El mecanismo de base para esta ADCC superior podría incluir los niveles relativos de expresión de los antígenos diana (CD20 y CD40), el grado de internalización del anticuerpo y la afinidad del anticuerpo para el receptor de FcγIIIa en las células NK. Por lo tanto, la influencia de estos factores sobre la actividad ADCC de CHIR-12.12 y rituximab se investigó.

Ejemplo 3: La cuantificación de moléculas de la superficie celular CD40 y CD20

[0248] La densidad cuantitativa de CD20 y CD40 en células CLL (Ejemplo 3) y el grado de internalización de anticuerpos (Ejemplo 4) fueron investigados como posibles razones para la diferencia antes descrita en la actividad de ADCC. Se comparó la actividad relativa a ADCC de CHIR-12.12 y rituximab contra las células CLL primarias ex vivo de 9 pacientes. CHIR-12.12 exhibieron una mayor ADCC de rituximab contra la CLL de todos los pacientes (véase la Figura 2A-D y Figura 3). El porcentaje de lisis media máxima por CHIR-12.12 y rituximab fue $48 \pm 15\%$ y $30 \pm 14\%$, respectivamente. CHIR-12.12 es mas de 10 veces más potente que rituximab, según lo medido por los valores ED50 (13,2 pm frente a 147,2 pm, respectivamente, Figura 6).

[0249] La mayor actividad y eficacia ADCC de CHIR-12.12 no dependía de una mayor densidad de moléculas CD40 de la superficie celular, ya que había de 1,3 a 14 veces números más altos de moléculas CD20 que de CD40 en la superficie celular (véase la Figura 5 y la Figura 6).

Métodos

[0250] Las células se preincubaron con la IgG1 humana a 1 mg/ml en tampón de tinción (PBS contiene 1% de BSA, 0,1% azida de sodio) para bloquear centros no específicos de unión. Se incubaron durante 30 minutos a 4 °C (en hielo). Entonces se añadió IgG1 humano de isotipo control conjugado con FITC, CHIR-12.12 conjugado con FITC, o rituximab conjugado con FITC a 100, 10, 1, 0,1 µg/ml, y se incubaron las células durante 30 minutos a 4 °C (en hielo). Las células se lavaron con tampón de tinción (Azida de Sodio PBS+1%FBS+0,1%), y se analizaron mediante FACS Calibur.

[0251] La intensidad de fluorescencia geométrica se midió por FACS. Las moléculas de fluorocromo soluble equivalente (MESF) se calcularon a continuación, sobre la base de la curva estándar establecida por gotas FITC calibradas.

Ejemplo 4: CH12.12 no induce la internalización tras la unión a CD40 en líneas celulares

[0252] Daudi, una línea celular de linfoma, y ARH77, una línea de células de MM, se utilizaron para evaluar el efecto de CH12.12 vinculante para la internalización. Las células se incubaron con la IgG1 humana (anticuerpo de control) o CH12.12 a 1 mg/ml en hielo (con azida de sodio al 0,1% para bloquear la internalización) o a 37 °C (sin azida sódica) durante 3 horas. Después de un lavado con tampón de tinción frío (PBS + 1% BSA + 0,1% de azida de sodio), las células se tiñeron con IgG-FITC de cabra anti-humano durante 30 minutos en hielo. La intensidad de fluorescencia geométrica (MFI) se registró mediante FACS Calibur. No se observó diferencia en IMF entre las células incubadas con CH12.12 en hielo en presencia de azida de sodio o a 37 °C en ausencia de azida sódica (Figura 7). Estos datos muestran que CH12.12, tras la unión a CD40, no se internaliza y se sigue visualizando en la superficie celular.

Ejemplo 5: Internacionalización de CHIR-12.12 y rituximab después de la unión a las células del paciente CLL: FACS y microscopía confocal

Metodología de Microscopio Confocal.

[0253] Las células fueron incubadas con Alexa 488 o CHIR-12.12 conjugado con FITC, rituximab, y IgG1 a 10 µg/ml, durante 3 horas a 40 °C (con Na 0,1% de azida) o a 37 °C (w/o azida Na). Las células fueron lavadas y fijadas con 2% de formaldehído, 5 min. a TA. Las células se lavaron entonces y se colocaron en láminas recubiertas de poli-L-lisina, montadas y selladas, y después se analizaron mediante formación confocal de imágenes.

Resultados

[0254] Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 8 (FACS) y las Figuras 9 y 10 (microscopio confocal). Los resultados de estos experimentos se resumen en la Figura 11. Estos estudios de internalización de

anticuerpos utilizando células primarias B y CLL realizadas por citometría de flujo y microscopía confocal muestran que tras la unión a CD40 a 37 °C, CHIR-12.12 queda uniformemente distribuida sobre la superficie de la célula, incluso después de 3 horas. En contraste, después de la unión a 37 °C, rituximab se redistribuye en tapas y se internaliza. Estos datos sugieren que la potente actividad ADCC de CHIR-12.12 puede estar relacionada con su capacidad de mostrarse de manera uniforme sobre la superficie de las células diana, lo que permite una interacción óptima con las células efectoras. Estos resultados sugieren que CHIR-12.12 pueden ser eficaces en la mediación de ADCC potente contra las células CLL *in vivo*.

Ejemplo 6: Análisis de Biacore de FcγRIIIa unido por Rituxan y CHIR-12.12

[0255] Las afinidades de los alelos FcγRIIIa aa158F y aa158V para CHIR-12.12 y rituximab se compararon por análisis estándar de Biacore®. La unión de CHIR-12.12 al alelo aa158F con una afinidad 4,6 veces mayor en comparación con rituximab (K_D de 2,8 μ M frente a 13 μ M, respectivamente). Los resultados de estos experimentos se resumen en la siguiente tabla:

	K_D (nM)	
	CHIR-12.12	Rituximab
FcγRIIIa 158V	492	466
FcγRIIIa 158F	2800	13000

Ejemplo 7: El efecto del polimorfismo FcγRIIIa en ADCC por células NK efectoras

[0256] La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un importante mecanismo de acción para muchos anticuerpos monoclonales comercializados y en investigación. Rituximab (Rituxan®), comercializado para el tratamiento de linfoma folicular no-Hodgkin (LNH) y activo en otras malignidades de células B, se cree que tiene ADCC como uno de sus principales mecanismos de acción. En particular, la actividad clínica de rituximab en LNH se ha demostrado que está correlacionado con el genotipo FcγRIIIa. Los pacientes con el polimorfismo FcγRIIIa 158aa de V/V o V/F son más sensibles a rituximab que aquellos con F/F (por ejemplo, véase Cartron et al. (Blood (2002), 99 (3): 754-758o Dall'Ozzo et al. Cancer Res. (2004) 64:4664-4669).

[0257] En estos experimentos, se purificaron células NK efectoras procedentes de múltiples donantes humanos que expresan diversos FcγRIIIa aa158 polimorfismos se evaluaron utilizando el linfoma humano de la línea celular Daudi como células diana (véanse las Figuras 12 y 13). Como se ilustra en esas figuras, CHIR-12.12 indujo ADCC potente con células NK de los tres genotipos. Los ED_{50} s CHIR-12.12 para la lisis de la línea celular Daudi fueron 4, 2, y 0,4 pM para F/F, V/F y V/V, respectivamente (Figura 13). Los ED_{50} s rituximab para la lisis de la línea celular Daudi fueron 53,21 y 9 pM para F/F, V/F, y V/V, respectivamente (Figura 13).

[0258] Las células NK efectoras purificadas procedentes de múltiples donantes humanos que expresan diversos polimorfismos FcγRIIIa aa158 también se evaluaron utilizando las células CLL de pacientes como células diana (véase la Figura 14). Se descubrió que CHIR-12.12 era un mediador más potente de ADCC que rituximab contra todas las células CLL ensayadas de los pacientes (Figura 14). Estos datos sugieren que CHIR-12.12 es un mediador ADCC más potente que rituximab, incluso con las células NK del genotipo aa158 V/V o F/F.

[0259] Estos resultados son sorprendentes ya que habría sido de esperar que CHIR-12.12 hubiera sido de manera significativa menos potentes en ensayos de ADCC utilizando células NK con el polimorfismo FcγRIIIa 158aa de F/F o V/F que aquellos con V/V. Una vez más, la actividad clínica de rituximab en LNH se ha demostrado como correlacionada con el genotipo FcγRIIIa. Los pacientes con el polimorfismo 158aa FcγRIIIa de V/V o V/F son más sensibles a rituximab que aquellos con F/F. Rituximab es también un anticuerpo IgG1 monoclonal que se une a un antígeno expresado en la superficie de las células B, y por lo que se habría esperado que CHIR-12.12 mostraría la misma preferencia para el polimorfismo FcγRIIIa V-158. En cambio, se descubrió que CHIR-12.12 induce ADCC potente con células NK de los tres genotipos.

[0260] Muchas modificaciones y otras realizaciones de las invenciones expuestas en este documento vendrán a la mente a un experto en la técnica al que conciernen estas invenciones que tienen el beneficio de las enseñanzas presentadas en las descripciones anteriores y los dibujos asociados. Por lo tanto, se debe entender que la invención no se limita a las realizaciones específicas descritas y que las modificaciones y otras realizaciones están destinadas a ser incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Aunque se emplean términos específicos en la presente memoria, se utilizan en un sentido genérico y descriptivo y no con fines de limitación.

LISTA DE SECUENCIAS

[261]

- 5 <110> Aukerman, Sharon Lea
Luqman, Mohammad

<120> Usos de anticuerpos anti-CD40
- 10 <130> PP028162.0002(319129)

<150> 60/732,730
<151> 01-11-2005
- 15 <160> 9

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0
- 20 <210> 1
<211> 720
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
<223> Secuencia de codificación para cadena ligera de CHIR-12.12 anti-CD40 anticuerpo humano

<221> CDS
<222> (1)...(720)
- 30 <400> 1
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

5	atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser	48
	1 5 10 15	
10	gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr	96
	20 25 30	
15	gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser	144
	35 40 45	
20	ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys	192
	50 55 60	
25	cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala	240
	65 70 75 80	
30	tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe	288
	85 90 95	
35	aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	336
	100 105 110	
40	tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys	384
	115 120 125	
45	gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro	432
	130 135 140	
50	cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu	480
	145 150 155 160	
55	ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp	528
	165 170 175	
60	aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp	576
	180 185 190	
65	agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys	624
	195 200 205	
70	gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln	672
	210 215 220	
75	ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *	720
	225 230 235	

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

<220>

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

<400> 2

```

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

<210> 3
 <211> 2016
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 3

5
10
15
20
25
30
35

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttccct gttgctatgt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagtttg tggagttctg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgagg aaagtaatag ataccatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac gctgtatctg 300
caaataaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatgggggt 360
atagcagcac ctgggcctga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagca 420
agtaccaagg gcccattccg cttccccctg gcgcccgtca gcaagagcac ctctgggggc 480
acagcggccc tgggtgcctt ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtccctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcacaa gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tggtagagga 720
ccagcacagg tggggagggt gtctgctgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca 780
tcccggctat gcagtcacag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttcacccg 840
gaggcctctg cccgccccac tcatgtctag ggagagggtc ttctggcttt tccccaggc 900
tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcagggtc 960
tgggctcaga cctgccaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc taagcccacc 1020
ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctcctccc agattccagt 1080
aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 1140
gtgcccaggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag 1200
agtagcctgc atccagggac aggcctcagc cgggtgctga cacgtccacc tccatctctt 1260
cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccacaag 1320
acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg 1380
aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 1440
caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1500
tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 1560
cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gacccgtggg gtgcgagggc 1620
cacatggaca gagggcggct cggccacccc tctgccctga gactgaccgc tgtaccaacc 1680
tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1740
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1800
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1860
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtccc gtgatgcatg aggtctgca caaccactac 1980
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 2016

```

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

<220>
<223> Cadena pesada de CHIR-12.12 anti-CD40 anticuerpo humano
<400> 4

50
55
60
65

```

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

```

5 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
10 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
15 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 Asp Val
275 280 285
20 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
25 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
30 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
35 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

40

45

50

55

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

60

<220>

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

65

<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

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

55 <210> 6
<211> 612
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>

60 <221> Otras características
<222>(0) ... (0)
<223> Secuencia de codificación para la isoforma corta del CD40 humano

65 <221> CDS
<222>(1) ... (612)

<400> 6

5
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc 48

10
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
15
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
20
agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60
25
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
30
aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg tgc 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
35
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
40
agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgc ccc ggc 384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
45
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
50
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
55
tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tgc gct gag agc cct ggt ggt 528
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
165 170 175
60
gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt 576
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
180 185 190
65
ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa 612
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *
195 200

<210> 7

<211> 203

60 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

65

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

10 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
165 170 175
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
180 185 190
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
195 200

15 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
165 170 175
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
180 185 190
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
195 200

20 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
165 170 175
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
180 185 190
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln
195 200

<210> 8
<211> 834
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otras características
<222>(0) ... (0)
<223> Secuencia de codificación para la isoforma larga del CD40 humano

<221> CDS
<222>(1) ... (834)

<400> 8

atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ccg acc 43
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr 15
1 5 10 15

ggt gtc cat cca gaa cca acc act gaa tgc aga gaa aaa cag tac cta 74
Ala Val His Pro Glu pro pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu 30
20 25 30

ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gta 144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln pro Gly Gln Lys Leu Val 45
35 40 45

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctc cct tgc ggt gaa 132
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Gln Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu 55
50 55 60

agg gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac 240
Ser Glu Phe Leu Arg Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His 65
65 70 75 80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg att 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
85 90 95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acc 316
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Gln Gly Trp His Cys Thr 105
105 110 115

agt gag gac tgt gag acc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgg acc ggc 384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly 115
115 120 125 130

ttt ggg gtc aag cag att gct aca gag gtt tct gat acc atc tgc gag 432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu 135
135 140 145

ES 2 400 660 T3

5 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

10 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

15 gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg 576
 Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu
 180 185 190

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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

45 gtg cag gag aga cag tga 834
 Val Gln Glu Arg Gln *

50 275

<210> 9
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

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
10 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
15 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
20 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

25 195 200 205
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
30 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

35

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un anticuerpo anti-CD40 para el uso en el tratamiento de cáncer o condición premaligna que está asociado con células que expresan tanto CD40 como CD20 en un paciente humano refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), en el que dicho paciente humano tiene un cáncer o enfermedad pre-maligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 identificado mediante un método que incluye:
 - 10 a) la identificación de un paciente humano con un cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
 - b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/V, V/F o F/F) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;

en el que dicho cáncer o condición premaligna es tratable con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F).
- 15 **2.** El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer o condición premaligna es un cáncer de linaje de células B.
- 20 **3.** El anticuerpo de la reivindicación 2, en el que dicho cáncer de linaje de células B se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia linfocítica pequeña (SLL), leucemia de células pilosas, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, y linfomas, tales como linfoma difuso linfocítico pequeño, folicular, DLBCL, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas, linfoma monocitoides de células B, linfoma esplénico, granulomatosis linfomatoide, linfomatosis intravascular, linfoma inmunoblástico, y linfoma relacionado con el SIDA.
- 25 **4.** El anticuerpo de la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer o enfermedad premaligna es una enfermedad hematológica maligna de células no-B.
- 30 **5.** El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que dicha malignidad hematológica de células no-B es leucemia mielocítica aguda.
- 35 **6.** El anticuerpo de la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho cáncer o enfermedad premaligna es un tumor sólido.
- 40 **7.** El anticuerpo de la reivindicación 6, en el que el tumor sólido se selecciona del grupo en el que se incluyen el cáncer de ovario, de pulmón, por ejemplo, el cáncer no microcítico de pulmón del carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, y tipos de carcinoma de células grandes, y cáncer de pulmón de células pequeñas, de mama, de colon, de riñón, incluyendo, por ejemplo, carcinomas de células renales, de vejiga, de hígado, incluyendo, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares gástricos, cervicales, de próstata, nasofaríngeo, y cánceres de tiroides, por ejemplo, cánceres de tiroides papilar, carcinoma de piel tales como melanoma, y sarcomas, incluyendo, por ejemplo, osteosarcomas y sarcomas de Ewing.
- 45 **8.** El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 incluye:
 - (i) la región determinante de complementariedad (CDR) de residuos de SEQ ID NO: 2; y
 - (ii) la región determinante de la complementariedad (CDR) de residuos de SEQ ID NO: 4.
- 50 **9.** El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 se selecciona de:
 - i) un anticuerpo monoclonal que incluye las secuencias de región variables y constantes que se muestran en SEQ ID NO: 2;
 - ii) un anticuerpo monoclonal que incluye las secuencias de región variables y constantes que se muestran en SEQ ID NO: 4;
 - 55 iii) un anticuerpo monoclonal que incluye las secuencias de región variables y constantes que se muestran en SEQ ID NO: 5;
 - iv) un anticuerpo monoclonal que incluye las secuencias de región variables y constantes que se muestran en SEQ ID NO: 2 y las secuencias de la región variable y constante mostradas en SEQ ID NO: 4, o
 - 60 v) un anticuerpo monoclonal que incluye las secuencias de región variables y constantes que se muestran en SEQ ID NO: 2 y las secuencias de la región variable y constante mostradas en SEQ ID NO: 5.
- 10.** El anticuerpo de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo monoclonal que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
 - 65 (i) SEQ ID NO: 2;
 - (ii) SEQ ID NO: 4;

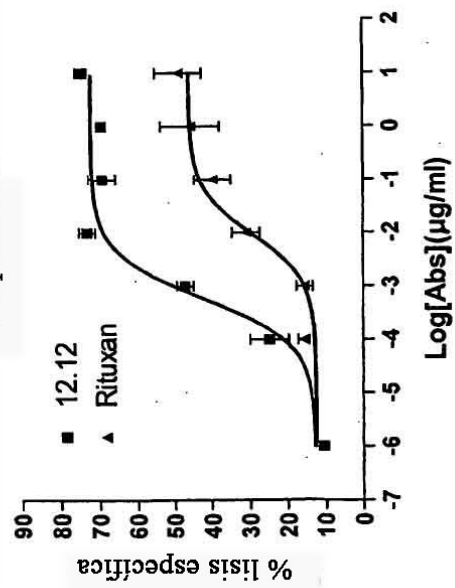
- (iii) SEQ ID NO: 5;
- (iv) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4; y
- (v) SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 5.

- 5 **11.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo monoclonal humano.
- 12.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho anticuerpo monoclonal anti-CD40 incluye una región constante de cadena pesada IgG1 humana.
- 10 **13.** El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.
- 15 **14.** El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es el anticuerpo monoclonal CHIR-12.12 producido por la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como Depósito de Patente N ° PTA-5543.
- 15.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 se produce en una línea celular CHO.
- 20 **16.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho uso resulta en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CD40 por las células asesinas naturales (NK) de un paciente humano que expresan FcγRIIIa.
- 25 **17.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es más potente que rituximab (Rituxan®) En un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), en el que el ensayo incluye la incubación de células que expresan CD40 y las células que expresan CD20 con células asesinas naturales (NK) humanas aisladas en presencia del anticuerpo correspondiente.
- 30 **18.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 es más potente que rituximab (Rituxan®) en un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón desnudo.
- 19.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 se une a CD40 humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 10^{-6} M a al menos aproximadamente 10^{-12} M.
- 35 **20.** El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en el que dicho anticuerpo anti-CD40 humano se une a FcγRIIIa-158V con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 0,5 mM y o se une a FcγRIIIa-158F humano con una afinidad (K_D) de al menos aproximadamente 12 μM.
- 40 **21.** Un método para identificar un paciente humano con un cáncer o condición premaligna tratable con un anticuerpo anti-CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que incluye:
 - a) la identificación de un paciente humano con un cáncer o condición premaligna que está asociado con las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
 - b) la determinación del genotipo FcγRIIIa-158 de dicho paciente humano (V/N, V/F o F/F) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;
- 45 en el que dicho cáncer o enfermedad pre-maligna es tratable con un anticuerpo anti-CD40 si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F).
- 50 **22.** Un método para seleccionar una terapia de anticuerpos para el tratamiento de un paciente humano que tiene un cáncer o enfermedad pre-maligna que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®), que incluye:
 - a) identificar un paciente humano que tiene cáncer o condición premaligna asociado con las células que expresan CD40 y que es refractario al tratamiento con rituximab (Rituxan®); y
 - b) la determinación del genotipo de dicho paciente humano FcγRIIIa-158 (V/V, V/F o F/F) utilizando una muestra biológica obtenida del paciente humano;
- 55 donde, si dicho paciente humano es homocigoto o heterocigoto para FcγRIIIa-158F (genotipo V/F o F/F), un anticuerpo anti-CD40 se selecciona para el tratamiento de dicho cáncer o enfermedad premaligna.
- 60

FIGURA 1A

ADCC-029 (Linea celular del linfoma Daudi)

Anticuerpos Anti-CD40 destruyendo células Daudi
con pM EC50

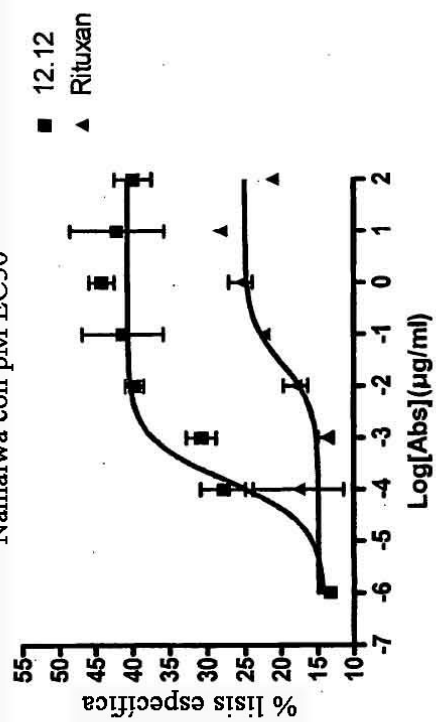


ED50 of 12.12: 4.07pM; Rituxan: 66.93pM

FIGURA 1B

ADCC-036 (Línea celular del linfoma Namalwa)

Anticuerpos Anti-CD40 ADCC destruyendo la actividad en células Namalwa con pM EC50

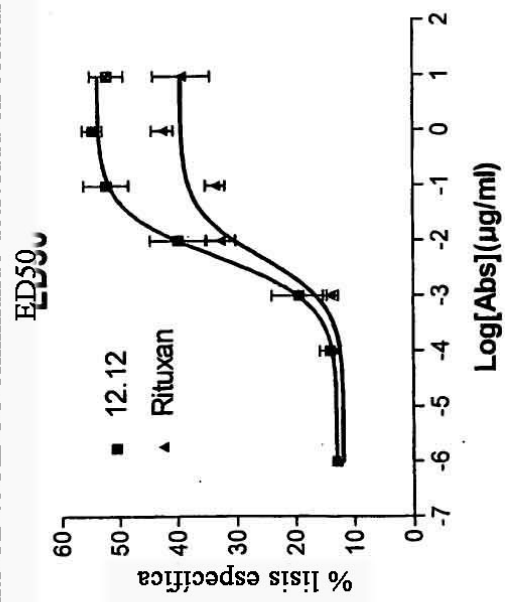


EC50 of 12.12: 1.01pM; Rituxan: 189.72pM

FICURA 1C

ADCC-028 (linea celular del mieloma multiple ARH77)

Anticuerpo Anti-CD40 ADCC eliminando actividad en celulas ARH77 con pM



ED50 of 12.12: 36.24pM; Rituxan: 34.77pM

FIGURA 1D

ADCC-041 (Linea celular del mieloma múltiple IM-9)

ADCC destruyendo actividad en células IM-9 con pM EC50

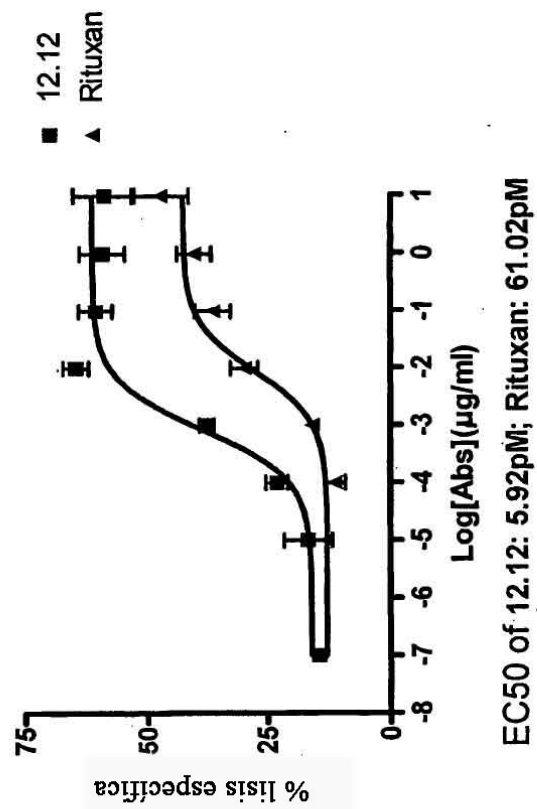
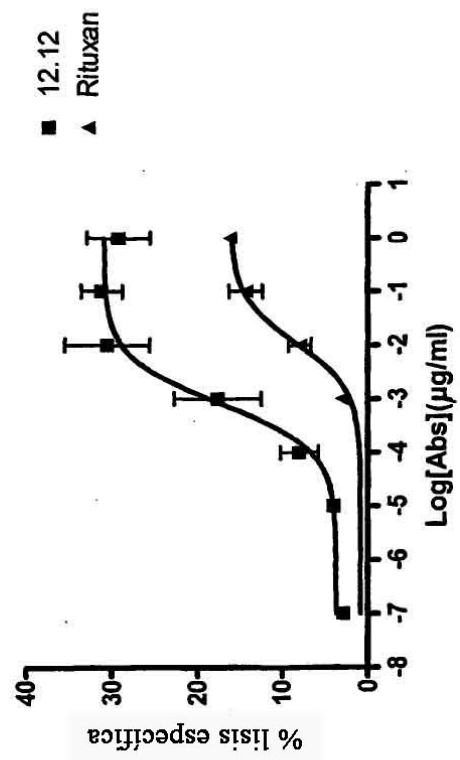


FIGURA 1E

ADCC-056 (EHEB, línea celular B-CLL)

Actividad ADCC en celular EHEB con pM EC50

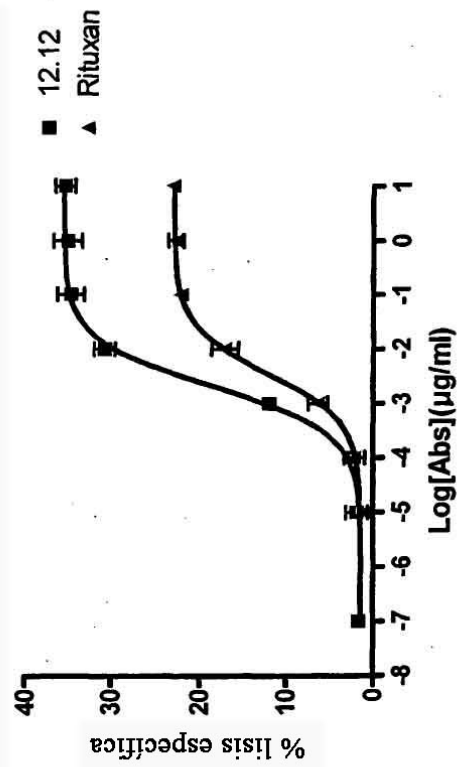


EC50 of 12.12: 5.56pM; Rituxan: 76.43pM

FIGURA 1F

ADCC-069 (CCRF-SB, línea celular de B-ALL)

ADCC destruyendo actividad en células CCRF-SB con pM EC50



EC50 of 12.12: 14.06pM; Rituxan: 24.11pM

FIGURA 2A: CHIR-12.12 mejor mediador ADCC que el rituximab contra células CLL del paciente

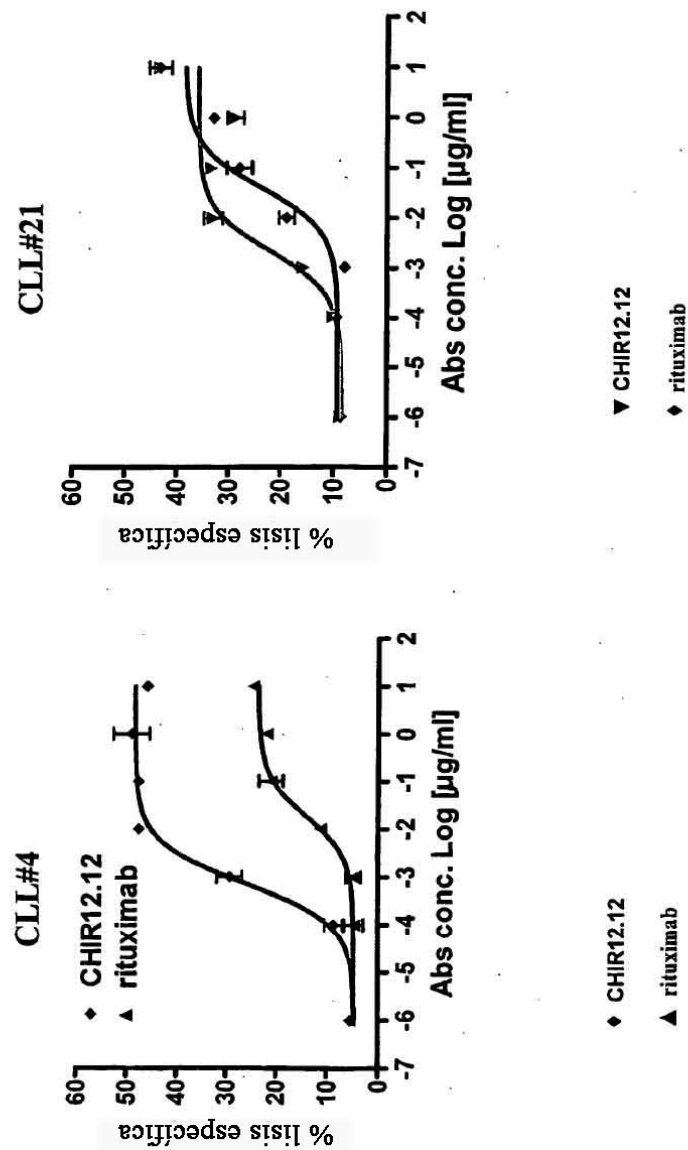
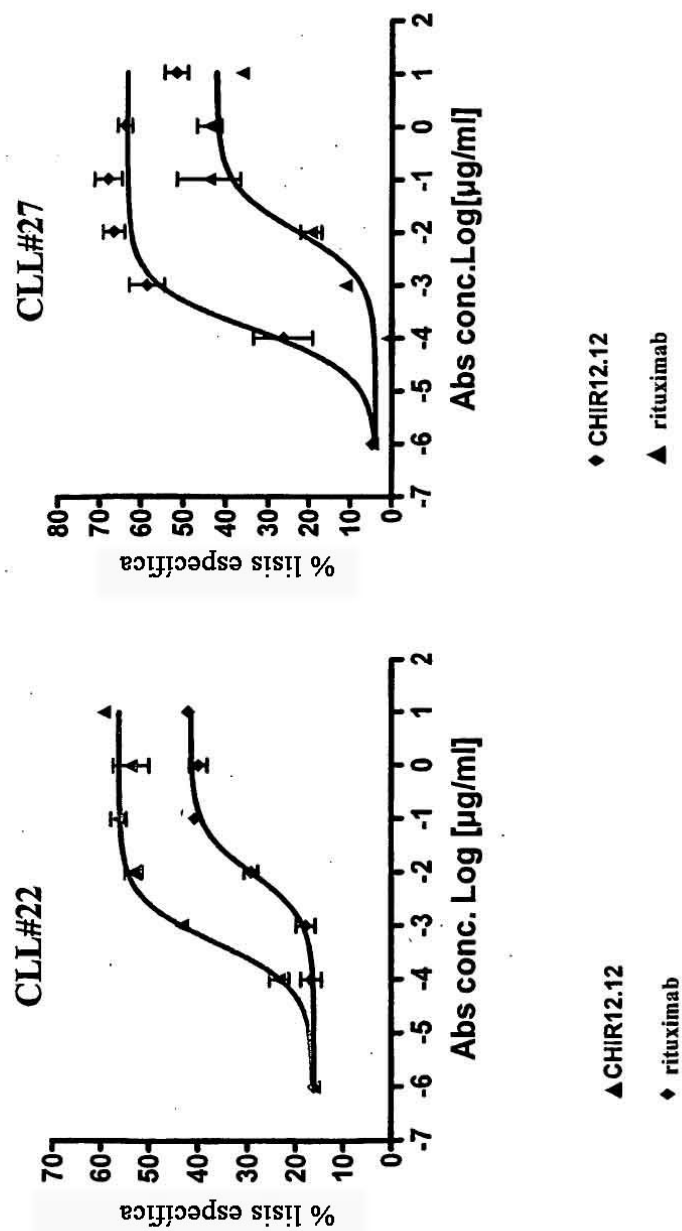


FIGURA 2B: CHIR-12.12 mejor mediador ADCC que el rituximab contra células CLL del paciente



FIGURC 2C: CHIR-12.12 mejor mediador ADCC que el rituximab contra células CLL del paciente

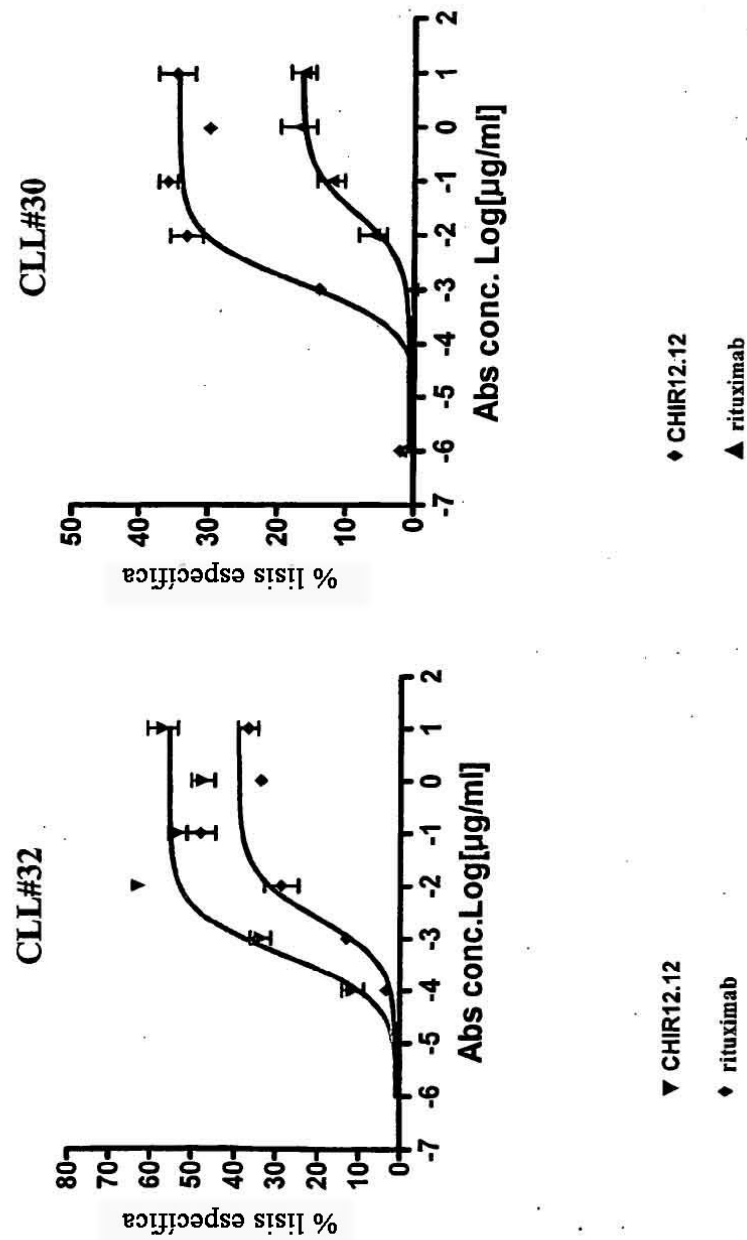


FIGURA 2D: CHIR-12.12 mejor mediador ADCC que el rituximab contra células CLL del paciente

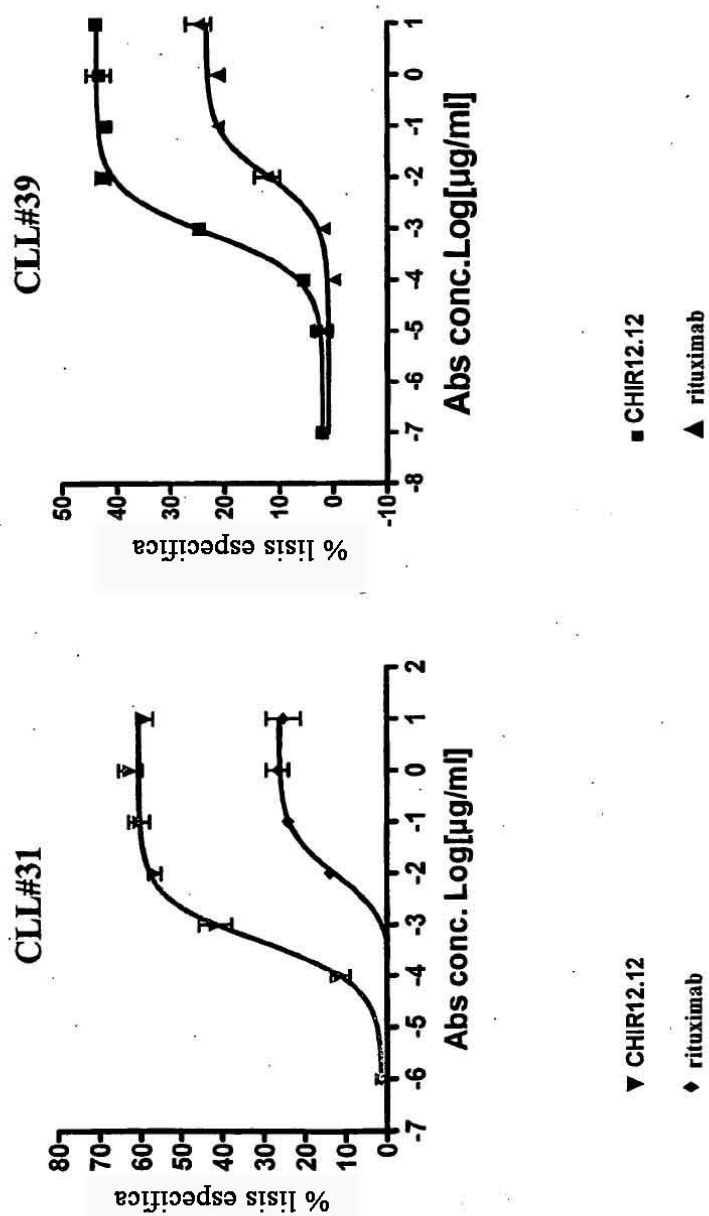


Figura 3: Comparativa de ADCC de CHIR-12.12 y rituximab contra células (n=9) CLL del paciente utilizando células NK de múltiples donantes

Abs conc.(µg/ml)	Fracción de la lisis mediada por rituximab en comparación con CHIR- 12.12	CHIR-12.12 EC50)p	Rituximab EC50(pM)
		13.25 ± 16.73	147.22 ± 135.6
10	0.57 ± 0.18		
1	0.62 ± 0.24		
0.1	0.56 ± 0.21		
0.01	0.29 ± 0.14		
0.001	0.14 ± 0.11		
0.0001	0.71 ± 2.18		
0.00001	-0.45 ± 0.49		

Figura 4: Variación de las actividades ADCC en las mismas células objetivo (CLL#) del donante NK

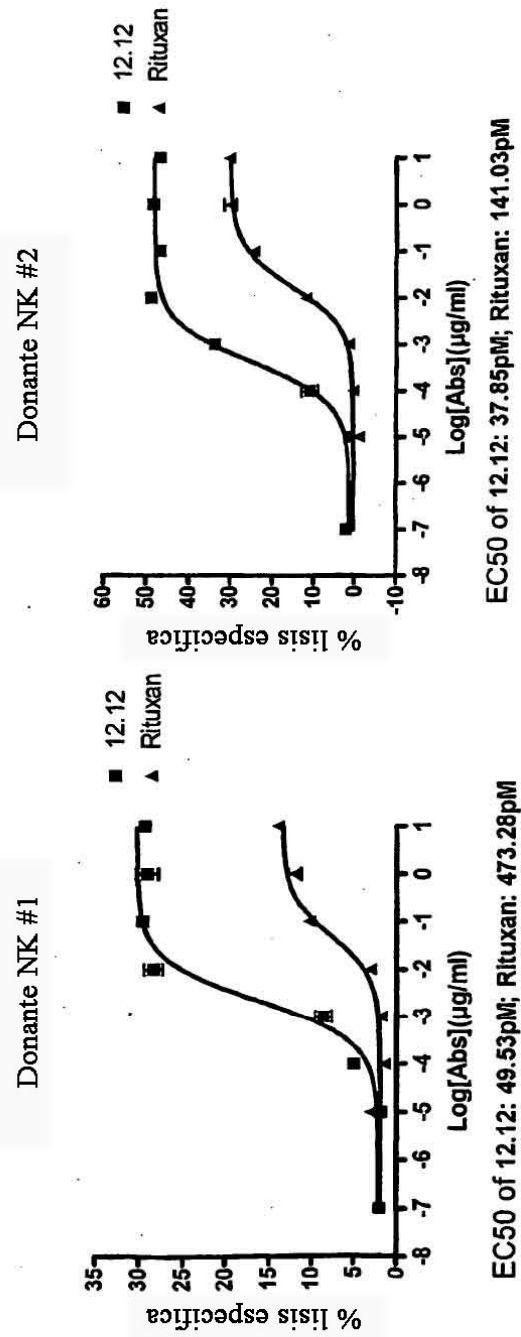


Figura 5: Cuantificación de moléculas CD40 y CD20 expresadas en las células del paciente CLL y en las células normales B

paciente# CLL	CHIR-12.12	Rituximab
	moléculas CD40	moléculas CD20
30	684 ± 8	9584 ± 44
31	1590 ± 79	6838 ± 135
27	1158 ± 57	1455 ± 126
32	2860 ± 38	28494 ± 547
33	1421 ± 201	5799 ± 160
celulas (n=2) del humano B	4067 ± 438	68358 ± 22830

Figura 6: Expresión relativa de moléculas CD40 y CD20 en células CLL del paciente y actividad ADCC

CLL paciente #	% Max lisis		Diferencia entre CHIR-12.12 y Rituximad	Proporción de moléculas objetivo CD20/CD40
	CHIR-12.12	Rituximab		
4	46.35	20.15	26.2	N/A
21	32.9	32.8	0.1	N/A
22	46.65	31.08	15.57	N/A
27	79.87	56.04	23.83	1.26
32	56.92	49.97	6.95	9.96
30	37.6	21.33	16.27	14.01
31	63.4	27.27	36.13	4.3
33(1)	27.71	12.33	15.38	
33(2)	48.57	28.63	19.94	4.08
39	44.18	21.13	23.05	N/A
Media	48.42	30.07		
SD	15.27	13.57		

Figura 7: Niveles de unión de superficie celular de CHIR-12.12 (medidos como intensidad de fluorescencia) después de 3 horas de incubación a 4°C y 37°C

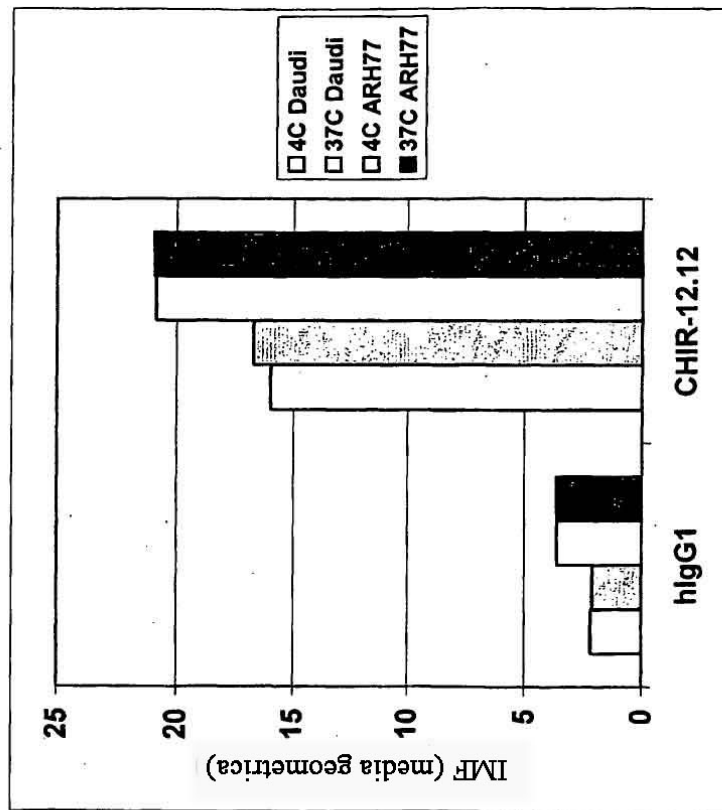
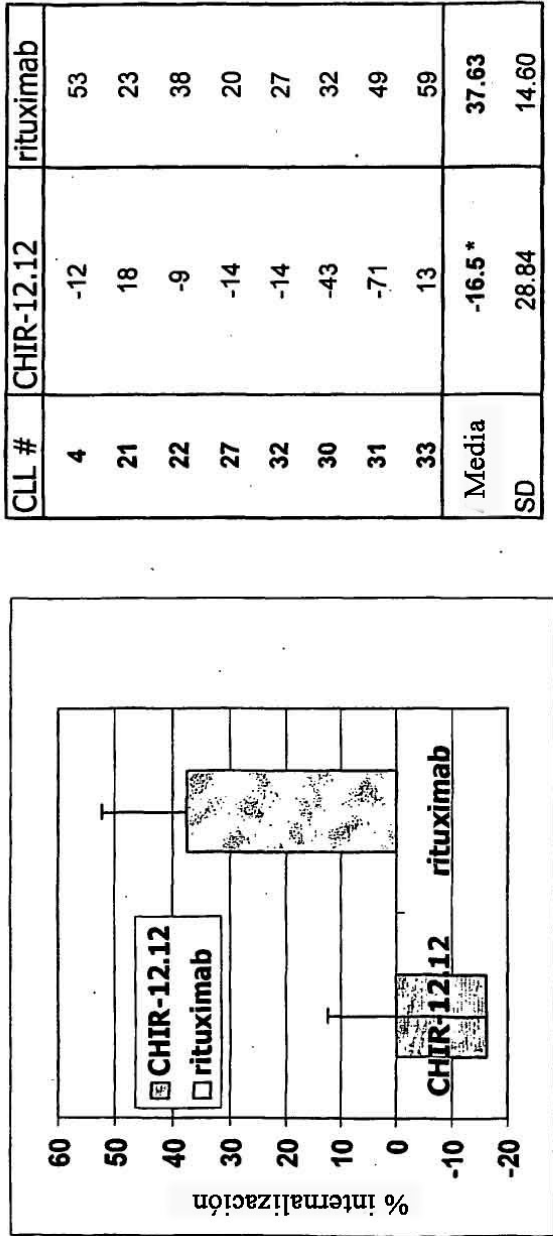


Figura 8: Porcentaje de internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células (n=8) CLL del paciente: FACS



GMF: Media geométrica de intensidad de fluorescencia

* % negativo de internalización indica una mejor unión de CHIR-12.12 a 37°C comparado a 4°C

Figura 9: Internalización de CHIR-12.12 y Rituximab en células humanas B normales: microscopía confocal

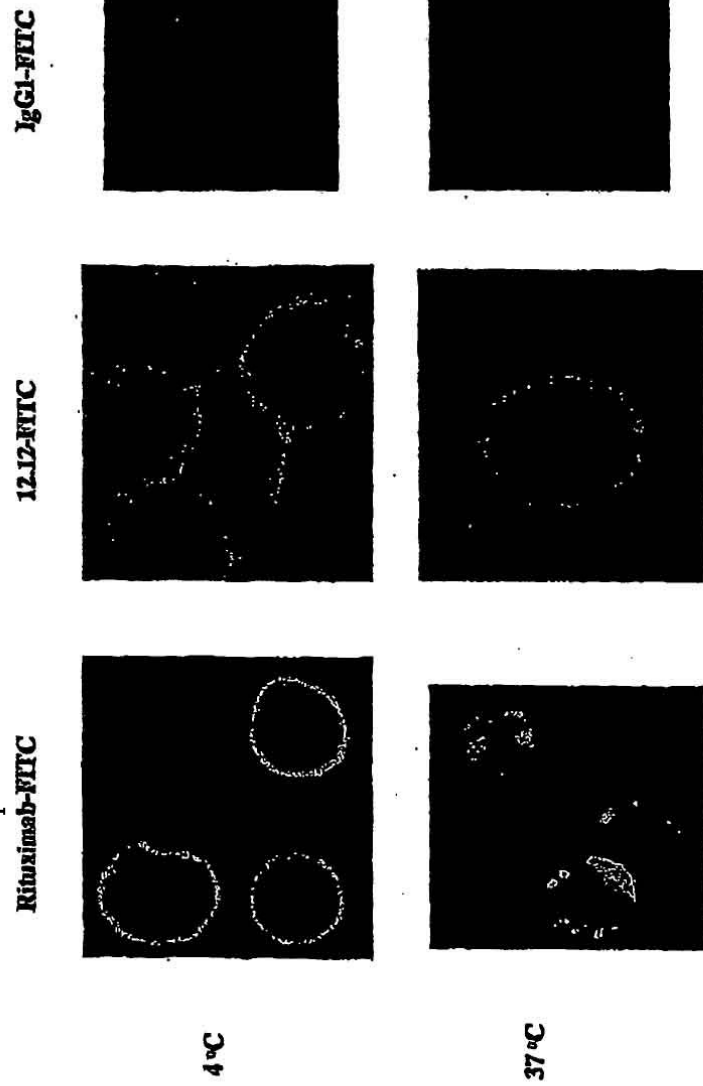


Figura 10: Internalización de CHIR-12.12 y rituximab en células CLL#33 del paciente: microscopía confocal

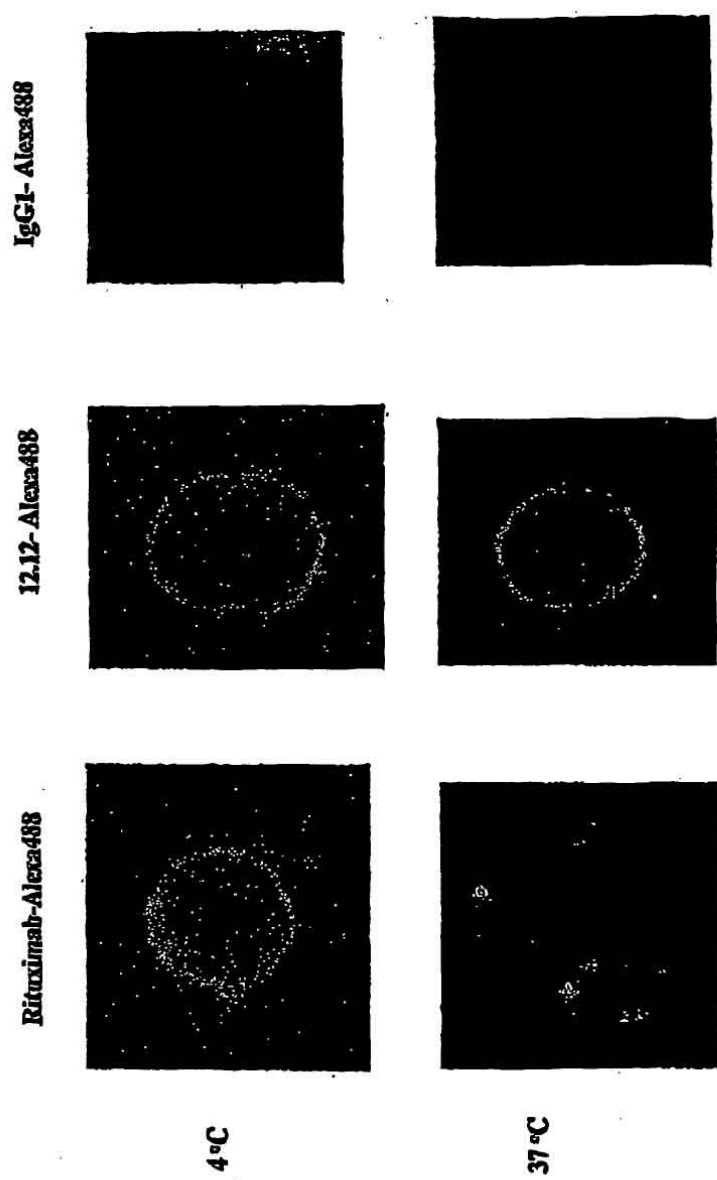


Figura 11: Relación entre actividad ADCC y internalización

CLL paciente #	% Max lisis			% internalización	
	CHIR-12.12	Rituximab	Diferencia entre CHIR-12.12 y Rituximab	CHIR-12.12	Rituximab
4	46.35	20.15	26.2	No	53
21	32.9	32.8	0.1	18	23
22	46.65	31.08	15.57	No	38
27	79.87	56.04	23.83	No	20
32	56.92	49.97	6.95	No	27
30	37.6	21.33	16.27	No	32
31	63.4	27.27	36.13	No	49
33(1)	27.71	12.33	15.38		
33(2)	48.57	28.63	19.94	13	59
39	44.18	21.13	23.05	N/A	N/A

FIGURA 12

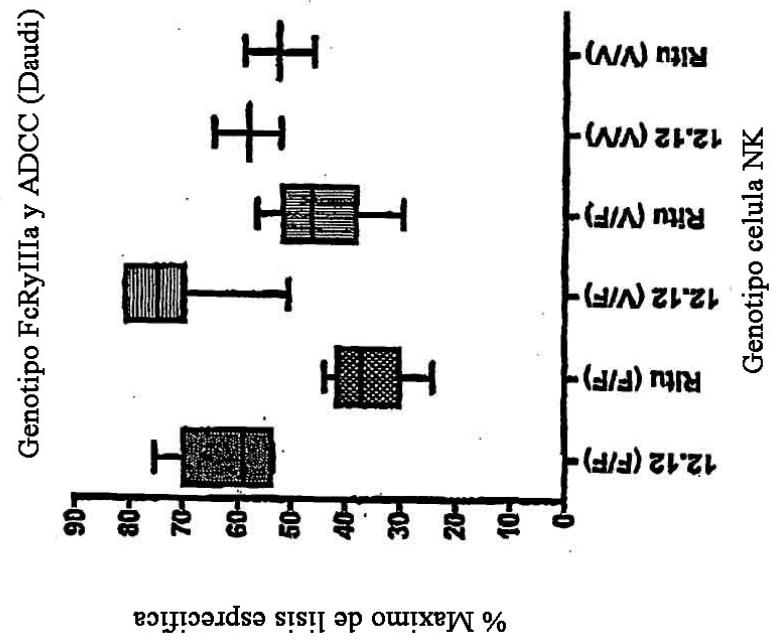


FIGURA 13

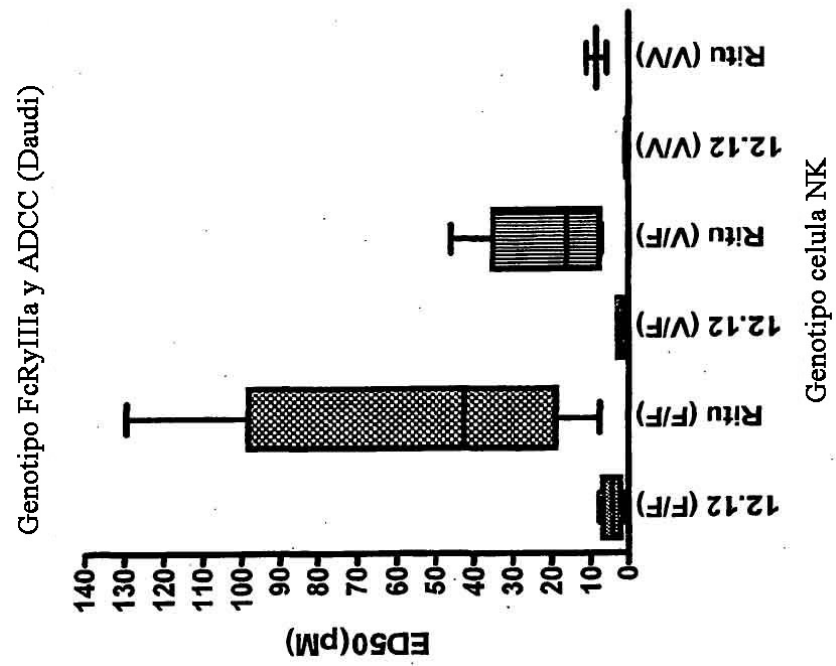


Figura 14: Comparativa de ADCC de CHIR-12.12 y rituximab contra células (n=9) CLL del paciente según células humanas NK de múltiples donantes con variante del genotipo Fcγ IIIA

CLL paciente #	% Max lisis			EC 50(pM)			Genotipo Fcγ IIIA del donante NK
	CHIR-12.12	Rituximab	Diferencia entre CHIR-12.12 y Rituximab	CHIR-12.12	Rituximab	Rituximab vs CHIR- 12.12 fold	
4	46.35	20.15	26.2	5.12	127.64	25	FF
21	32.9	32.8	0.1	14.86	272.68	18	FF
22	46.65	31.08	15.57	3.24	62.08	19	FF
27	79.87	56.04	23.83	0.99	71.54	72	VF
32	56.92	49.97	6.95	3.14	16.58	5	VF
30	37.6	21.33	16.27	8.87	170.34	19	VV
31	63.4	27.27	36.13	3.23	64.59	20	VV
33(1)	27.71	12.33	15.38	49.53	473.28	10	FF
33(2)	48.57	28.63	19.94	37.85	141.03	4	VV
39	44.18	21.13	23.05	5.63	72.42	13	VF
Mean	48.42	30.07	18.34	13.25	147.22	20.53	
SD	15.27	13.57	10.09	16.73	135.60	19.43	