

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 002**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2004 E 10162787 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2218461**

54 Título: **Formulación de anticuerpo contra CD40 y procedimientos**

30 Prioridad:

**22.12.2003 US 531639 P**

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

**18.08.2016**

73 Titular/es:

**PFIZER PRODUCTS INC. (100.0%)  
Eastern Point Road  
Groton, CT 06340, US**

72 Inventor/es:

**BEDIAN, VAHE;  
CUSMANO, JOHN DANIEL y  
GLADUE, RONALD PAUL**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 580 002 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**

Formulación de anticuerpo contra CD40 y procedimientos

**Antecedentes de la invención**

5 CD40 es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR). Se expresa en células presentadoras de antígeno (linfocitos B, células dendríticas, monocitos), precursores hematopoyéticos, células endoteliales, células de músculo liso, células epiteliales, así como la mayoría de los tumores humanos. (Grewal y Flavell, Ann. Rev. Immunol., 1996, 16: 111-35; Toes y Schoenberger, Seminars in Immunology, 1998, 10 (6): 443-8). Estudios que usan agentes agonistas de CD40 han informado de que la estimulación del receptor CD40 provoca una cascada de efectos asociados con la actividad antitumoral. Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación del receptor CD40 en células presentadoras de antígenos potencia su maduración, la función de presentación de antígenos, el potencial coestimulador y su liberación de citocinas inmunorreguladoras (Lee et al., PNAS USA, 1999, 96 (4): 1421-6; Cella et al., J. Exp. Med., 1996, 184 (2): 747-52). También se ha informado de agonistas de CD40 que promueven la apoptosis de tumores CD40+ y potencian su capacidad de ser procesados por células dendríticas (von Leoprechting et al., Cancer Res, 1999, 59: 1287-1294; Sotomayo et al., Nature Medicine, 1999, 5 (7): 780-87; Eliopoulos et al., Mol. Cell Biol., 2000, 29 (15): 5503-15; Ziebold et al., Arch. Immunol. Therapiae Experimentalis, 2000, 48 (4): 225-33; Hoffmann et al., J. Immunol., 2001, 24 (2): 162-71). La importancia de estos efectos estimuladores inmunitarios y antitumorales directos se ha ilustrado en modelos animales en los que se ha demostrado que anticuerpos agonistas de CD40 evitan el crecimiento tumoral e invierten la tolerancia tumoral (Diehl et al., Nature Med., 1999, 5(7): 774-9; Francisco et al., Cancer Res., 2000, 60 (12): 32225-31). Se mencionan anticuerpos contra CD40 en las siguientes publicaciones de patente: U.S. 5.786.456; U.S. 5.674.492; WO 02/088186; US 2003059427; US 20020142358; WO 01/56603; U.S. 5.801.227; EP 806963; WO 88/06891; y WO 94/04570. Se describen formulaciones de proteínas en el documento WO02/30463. Sin embargo, no se han descrito procedimientos altamente eficaces de administración y formulaciones para anticuerpos contra CD40. También sería útil una formulación estable adecuada para su uso en dicho tratamiento.

**Sumario de la invención**

De acuerdo con la presente divulgación, se describe un procedimiento de tratamiento del cáncer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente de al menos dos ciclos, comprendiendo cada ciclo (a) un periodo de dosificación durante el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo agonista de CD40 a dicho paciente y, después de ello, (b) un periodo de descanso. En un modo de realización de la divulgación, la administración produce una concentración plasmática del anticuerpo de 0,01 mg/ml a 10 mg/ml durante al menos tres horas y el periodo de descanso es durante al menos 1 semana. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el periodo de dosificación es durante al menos un día, 1-5 días o 1-3 días. En otros modos de realización, el periodo de descanso es de 1-8, 1-6 semanas, 2-5 semanas o 3-4 semanas.

De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista de CD40 produce la concentración plasmática de dicho anticuerpo de aproximadamente 0,03 µg/ml a 10 µg/ml, de aproximadamente 0,03 µg/ml a 1 µg/ml, de aproximadamente 0,03 µg/ml a 0,3 µg/ml, o de aproximadamente 0,1 µg/ml a 0,3 µg/ml durante 3 a 120 horas. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la concentración plasmática especificada se mantiene durante al menos un día, de 24 a 30 horas, de 24 a 36 horas, de 24 a 48 horas, de 24 a 72 horas, de 24 a 96 horas, o de 24 a 120 horas. En algunos modos de realización, la concentración plasmática se mantiene durante de 3 a 96 o de 12 a 72 horas.

De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo agonista de CD40 administrado durante el periodo de dosificación es de aproximadamente 0,03 a 3,0 mg/kg/día, de 0,1 a 3,0 mg/kg/día, de 0,1 a 1,0 mg/kg/día o de aproximadamente 0,1 a 0,3 mg/kg/día. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la dosificación se administra durante 1-5 días o 1-3 días, ya sea consecutivamente o en días alternos.

El régimen de dosificación intermitente de anticuerpos agonistas de CD40, como se describe anteriormente en relación con el tratamiento de tumores, también es útil en la potenciación de respuestas inmunitarias en los pacientes y, por lo tanto, también se divulga dicho uso. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la potenciación de la respuesta inmunitaria de un paciente provoca un incremento en la expresión de CD23 o MHC-II en linfocitos B en la sangre completa del paciente que, por ejemplo, se puede medir al final de un periodo de dosificación.

De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el anticuerpo anti-CD40 se administra a un paciente que padece inmunodeficiencias primarias y/o combinadas, incluyendo inmunodeficiencia dependiente de CD40 con síndrome de Hiper-IgM, inmunodeficiencia variable común, agammaglobulinemia de Bruton, deficiencias de subclase de IgG e IDCG ligada al cromosoma X (mutaciones en la cadena gamma común). De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el anticuerpo anti-CD40 se administra para tratar a un paciente que está inmunodeprimido, por ejemplo, debido a quimioterapia, o tiene una enfermedad inmunodebilitante, incluyendo cualquier enfermedad de inmunodeficiencia adquirida, tal como el VIH. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el anticuerpo anti-CD40 se administra para potenciar la inmunidad de un paciente de edad avanzada. De

acuerdo con la presente divulgación, se describe que el anticuerpo anti-CD40 se administra para tratar a un paciente que tiene una infección bacteriana, vírica, fúngica o parasitaria. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que un anticuerpo agonista humano anti-CD40 se puede administrar profilácticamente a un paciente que, debido a su edad, enfermedad o mala salud en general, es susceptible a infección, para evitar o reducir el número o la gravedad de las infecciones.

La presente divulgación también describe un procedimiento de tratamiento de un tumor en un paciente, que comprende administrar un anticuerpo agonista de CD40 y un inhibidor de la replicación del ADN, preferentemente un derivado de platino, especialmente cisplatino. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el cisplatino se administra por vía intravenosa. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el cisplatino se administra en una cantidad de aproximadamente 25 a 300 mg por m<sup>2</sup> de aproximadamente 50 a 150 mg por m<sup>2</sup> o de aproximadamente 75 a 100 mg por m<sup>2</sup> de área de superficie corporal del paciente. De acuerdo con la presente divulgación, se describe que el cisplatino se administra en una dosis (por ejemplo, una única infusión intravenosa). En otro modo de realización, se administra en 2-5 días. En ciertos modos de realización, la cantidad del anticuerpo contra CD40 que se administra en combinación con cisplatino se administra en una dosificación de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 a 1,0 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 a 0,3 mg/kg.

De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la administración de cisplatino se combina con el régimen de dosificación intermitente del anticuerpo contra CD40, administrándose el cisplatino durante uno o más de los periodos de dosificación o los periodos de descanso.

De acuerdo con la presente divulgación, se describe que la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de un tumor en un paciente en necesidad de dicho tratamiento administrando al paciente un anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo en una dosificación de menos de 1 mg/kg/día, en el que la concentración sérica C<sub>máx</sub> en el paciente como resultado de la administración del anticuerpo es de menos de 50 µg/ml. En un modo de realización, la dosis está entre de 0,1 a 0,3 mg/kg y la concentración sérica C<sub>máx</sub> del anticuerpo en el paciente está entre 0,5 y 10 µg/ml.

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica líquida estable adecuada para administración parenteral, que comprende un anticuerpo anti-CD40 a un pH de 5,0-6,0 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, siendo estable la formulación durante un periodo de al menos tres meses. La formulación tiene preferentemente una concentración de anticuerpo contra CD40 de al menos aproximadamente 5 mg/ml. En un modo de realización, la formulación comprende un anticuerpo anti-CD40, acetato de sodio, cloruro de sodio y polisorbato 80. Preferentemente, comprende acetato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 140 mM, y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. El anticuerpo anti-CD40 tiene preferentemente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo 21.4.1 o de acuerdo con la divulgación 3.1.1.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la inhibición del crecimiento del tumor K562 CD40(-) por un anticuerpo agonista de CD40 en presencia de células inmunitarias. Los animales recibieron una única inyección (i.p.) de 21.4.1 o KLH en el momento de la provocación del tumor. Se informa del tamaño del tumor para cada animal individual el día 21 en mm<sup>2</sup> (10 animales por grupo). El estudio es representativo de al menos 5 estudios separados.

La figura 2 muestra la inhibición del crecimiento de la línea celular de tumor de mama humano BT 474 por un anticuerpo agonista de CD40. Los valores representan mediciones de los tumores individuales tomadas el día 53 después de la inyección usando 6 animales por grupo. El estudio es representativo de dos experimentos separados. La media para cada grupo de tratamiento se indica por la línea horizontal.

La figura 3 muestra la inhibición del crecimiento tumoral CD40(+) por un anticuerpo agonista de CD40, solo o en presencia de células inmunitarias. Los animales recibieron una única inyección de 21.4.1 en el momento de la provocación del tumor. (A) Los tumores se inyectaron solos o (b) junto con linfocitos T de sangre periférica humana y CD. Los puntos de datos representan el tamaño del tumor (mm<sup>2</sup>) para cada animal individual. La media para cada grupo de tratamiento (N = 10) se indica por la línea horizontal. El estudio es representativo de al menos 3 experimentos separados.

La figura 4 muestra los efectos de un anticuerpo agonista de CD40 en el retraso de la mortalidad inducida por un linfoma de linfocitos B (Daudi). Los puntos de datos se refieren a la media del número de animales supervivientes, N = 10 por grupo.

La figura 5 muestra la regresión tumoral provocada por una politerapia con un anticuerpo agonista de CD40 y cisplatino.

#### Descripción detallada de los modos de realización preferentes

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo agonista de CD40" o "anticuerpo agonista anti-CD40" significa un anticuerpo que se une específicamente a la molécula CD40 humana e incrementa una o más actividades de CD40 en al menos aproximadamente un 20 % cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa CD40. En algunos modos de realización, el anticuerpo activa la actividad de CD40 en al menos un 40 %,

50 %, 60 %, 70 %, 80 % u 85 %. En algunos modos de realización, la activación se produce en presencia de CD40L. En algunos modos de realización, la actividad del anticuerpo activador se mide usando un ensayo de regulación por incremento de molécula de superficie en sangre completa. En otro modo de realización, la actividad del anticuerpo activador se mide usando un ensayo de células dendríticas para medir la liberación de IL-12. En otro modo de realización, la actividad del anticuerpo activador se mide usando un modelo de tumor *in vivo*.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento de unión del mismo que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Se producen fragmentos de unión por técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv y anticuerpos monocatenarios. Se entiende que la referencia a un anticuerpo intacto (por ejemplo, completo, de longitud completa, etc.) en el presente documento incluye un anticuerpo que tiene una delección de lisina terminal en la cadena pesada, lo que se produce comúnmente durante la expresión recombinante.

Preferentemente, el anticuerpo agonista de CD40 es un anticuerpo humano. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" significa un anticuerpo en el que las secuencias de dominio variable y constante se obtienen de secuencias humanas. Se describen anticuerpos humanos contra CD40 en detalle en la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/348.980, presentada el 9 de noviembre de 2001, y la solicitud internacional PCT n.º PCT/US02/36107 (ahora publicada como WO 03/040170) presentada el 8 de noviembre de 2002. Los anticuerpos humanos proporcionan una ventaja sustancial en los procedimientos de tratamiento de la presente divulgación, ya que se espera que minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas que están asociadas con el uso de anticuerpos no humanos en pacientes humanos.

Anticuerpos humanos anti-CD40 ejemplares útiles para la presente invención incluyen anticuerpos que tienen las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos denominados 21.4.1; también se divulgan en el presente documento anticuerpos denominados 3.1.1, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4ML83V, 3.1.1 H-A78T, 3.1.1 HA78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1 H-D16E, 23.29.1, 24.2.1 y 23.28.1 L-C92A.

Se divulgan por la presente anticuerpos que reconocen los mismos epítomos o similares, o una parte de los mismos, como cualquiera de los anticuerpos ejemplares. Es decir, como entendería un experto en la técnica basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, un anticuerpo que compite con un anticuerpo de la invención y la divulgación (por ejemplo, 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1HA78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1 HD16E, 23.29.1, 24.2.1, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V y 23.28.1L-C92A, y similares) puede ser útil, como se divulga en otra parte en el presente documento. Un anticuerpo de interés que compite con un anticuerpo ejemplificado en el presente documento se puede identificar fácilmente usando procedimientos bien conocidos en la técnica para la caracterización de anticuerpos. Más específicamente, los ensayos para evaluar las características de unión de un anticuerpo, así como para comparar esas características de unión con las de otro anticuerpo, son bien conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, ensayos basados en ELISA, uso de estudios de unión BIAcore, así como los detallados en la publicación de la solicitud de patente de EE. UU. n.º 2003/0157730A1 para Walker et al.

Por el término "competir", como se usa en el presente documento con respecto a un anticuerpo, se entiende que un primer anticuerpo compite por la unión con un segundo anticuerpo, en el que la unión del primer anticuerpo con su epítipo análogo está disminuida de forma detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en la que la unión del segundo anticuerpo a su epítipo también está disminuida de forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo a su epítipo sin que ese segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo a su respectivo epítipo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe de forma detectable la unión del otro anticuerpo con su epítipo o ligando análogo, ya sea en la misma, mayor o menor medida, se dice que los anticuerpos "compiten de forma cruzada" entre sí por la unión de su(s) respectivo(s) epítipo(s). Por ejemplo, los anticuerpos de competición cruzada se pueden unir al epítipo, o a parte del epítipo, al que se unen los anticuerpos de la invención y la divulgación (por ejemplo, 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1, 24.2.1, 3.1.1H-A78TV88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V y 23.28.1 L-C92A). Por la presente se divulgan tanto anticuerpos competidores como de competición cruzada.

Además, los anticuerpos ejemplares se pueden modificar adicionalmente por sustitución, adición o delección de uno o más residuos de aminoácidos sin eliminar la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno y ejercer su función agonista. De hecho, un anticuerpo denominado "3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V", comprende tres sustituciones de aminoácidos en la región variable de cadena pesada, es decir, una sustitución de alanina a treonina en el número de residuo de aminoácido 78, una sustitución de valina a alanina en el número de residuo de aminoácido 88, y una sustitución de valina a alanina en el número de residuo de aminoácido 97 (SEQ ID NO: 9), todos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 3.1.1 (SEQ ID NO: 1). Además, el anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V comprende además una sustitución de aminoácido de leucina a metionina en el número de residuo de aminoácido 4 y una sustitución de leucina a valina en el número de residuo de aminoácido 83 en la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 10) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 3.1.1 (SEQ ID NO: 3). Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de las cadenas pesadas (SEQ ID NO: 2) y las cadenas ligeras

## ES 2 580 002 T3

(SEQ ID NO: 4) de los anticuerpos 3.1.1 y 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1LL4M- L83V son iguales. El anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V también se denomina "3.1.1H3L2" para reflejar que el anticuerpo comprende tres sustituciones de aminoácidos en la cadena pesada y dos sustituciones de aminoácidos en la cadena ligera con respecto al anticuerpo 3.1.1.

- 5 Por lo tanto, los anticuerpos divulgados se pueden modificar por sustitución, adición o delección de uno a diez, uno a cinco, o uno a tres residuos de aminoácidos, por ejemplo, en una CDR o región estructural. Los anticuerpos ejemplares y procedimientos de producción de los mismos se describen en detalle en la solicitud provisional de EE. UU. n.º 60/348.980, presentada el 9 de noviembre de 2001, y la solicitud internacional PCT n.º PCT/US02/36107 (WO 03/040170), presentada el 8 de noviembre de 2002. Los hibridomas 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 y 21.4.1 se depositaron de acuerdo con el Tratado de Budapest, en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20.110-2209, el 6 de agosto de 2001. Los hibridomas 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 y 24.2.1 se depositaron en la ATCC el 16 de julio de 2002. A los hibridomas se les han asignado los siguientes números de depósito:

<u>Hibridoma</u>	<u>N.º de depósito</u>
3.1.1 (LN 15848)	PTA-3600
7.1.2 (LN 15849)	PTA-3601
10.8.3 (LN 15850)	PTA-3602
15.1.1 (LN 15851)	PTA-3603
21.4.1 (LN 15853)	PTA-3605
21.2.1 (LN 15874)	PTA-4549
22.1.1 (LN 15875)	PTA-4550
23.5.1 (LN 15855)	PTA-4548
23.25.1 (LN 15876)	PTA-4551
23.28.1 (LN 15877)	PTA-4552
23.29.1 (LN 15878)	PTA-4553
24.2.1 (LN 15879)	PTA-4554

- 15 Las secuencias de estos anticuerpos son conocidas, y se describen en el documento WO 03/040170. Por conveniencia, se muestran a continuación las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de dos de estos anticuerpos:

Anticuerpo 3.1.1:

3.1.1: Secuencia de proteína de cadena pesada	<p>Variable (SEQ ID NO: 1):</p> <p><b>QVQLVESGGGVWQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG            MHWVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADS VKG            RFTISRDN SKNALYLQMNSLRVEDAVYYCVRRG            HQLVLGYYYYNGLDVWGQGTTVTVSS</b></p> <p>Constante (SEQ ID NO: 2):</p> <p><b>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE            PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT            VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ERKCCV            ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT            CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTPRE            EQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG            LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ            VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP            MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH            EALHNHYTQKSLSLSPGK</b></p>
3.1.1: Secuencia de proteína de cadena ligera	<p>Variable (SEQ ID NO: 3):</p> <p><b>DIVLTQSPSLSPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYN            FLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGV PDRFSGS            GSGTDFTLKISRLEAEDVGVYYCMQALQTPRTFG            QGTKVEIK</b></p> <p>Constante (SEQ ID NO: 4):</p> <p><b>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR            EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSL            STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR            GEC</b></p>

<p>3.1.1H-A78T-V88A-V97A: Secuencia de proteína de cadena pesada</p>	<p>Variable (SEQ ID NO: 9):   <b>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYG          MHWVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKG          RFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARRGH          QLVLGYYYYNGLDVWGQGT TVTVSS</b>          Constante (SEQ ID NO: 2):  <b>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE          PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT          VPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK TVERKCCV          ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT          CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE          EQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKG          LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ          VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP          MLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH          EALHNHYTQKSLSLSPGK</b></p>
<p>3.1.1 L-L4M-L83V: Secuencia de proteína de cadena ligera</p>	<p>Variable (SEQ ID NO: 10):   <b>DIVMTQSPLSLPVT PGEPASISCRSSQSLLYSNGY          NFDWYLQKPGQSPQLLIYLG SNRASGVPDRFSG          SSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTF          GGGTKVEIK</b>          Constante (SEQ ID NO: 4):  <b>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPR          EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS          STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR          GEC</b></p>

Anticuerpo 21.4.1:

<p>21.4.1: Secuencia de proteína de cadena pesada</p>	<p>Variable (SEQ ID NO: 5):   <b>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYM          HWVRQAPGQGLEW MWGWINPDSGGTNYAQKFQG          RVTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQ          PLGYCTNGVCSYFDYWGQGT LVTVSS</b>          Constante (SEQ ID NO: 6):  <b>ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE          PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT          VPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDK TVERKCCV          ECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT          CVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE          EQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKG          LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ          VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP          MLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH          EALHNHYTQKSLSLSPGK</b></p>
<p>21.4.1: Secuencia de proteína de cadena ligera</p>	<p>Variable (SEQ ID NO: 7):   <b>DIQMTQSPSSVSASVGD RVTITCRASQGIYSWLAW          YQQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTD          FTLTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGKVEI          K</b>          Constante (SEQ ID NO: 8):  <b>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPR          EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS          STLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR          GEC</b></p>

Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 21.4.1 comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 5-8, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 3.1.1. comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO: 1-4, y la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V comprende las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 4. Los aminoácidos que difieren entre 3.1.1 y 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V están subrayados.

Se entendería que, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, un anticuerpo 3.1.1 de la invención abarca cualquier combinación de las regiones variables pesada y/o ligera expuestas en el presente documento. Es decir, un anticuerpo puede comprender cualquier combinación de regiones variables, incluyendo, pero sin limitarse a, 3.1.1 H (SEQ ID NO: 1)/3.1.1L (SEQ ID NO: 3), 3.1.1 H (SEQ ID NO: 1)/3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO: 10), 3.1.1 H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO: 9)/3.1.1L (SEQ ID NO: 3), y, más preferentemente, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO: 9)/3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO: 10).

De acuerdo con la presente divulgación, el tratamiento de tumores inhibe la proliferación de células cancerosas, inhibe o evita un incremento en el peso o volumen del tumor, y/o provoca una disminución en el peso o volumen del tumor. En algunos modos de realización, el tratamiento de tumores prolonga la supervivencia del paciente. De acuerdo con la presente divulgación, se inhibe el crecimiento tumoral al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, en comparación con los no tratados. En algunos modos de realización, el tumor es positivo para CD40. De acuerdo con la presente divulgación, el tumor es negativo para CD40. El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido, tal como linfoma. De acuerdo con la presente divulgación, se administra un anticuerpo anti-CD40 a un paciente que tiene un tumor que es canceroso.

Los pacientes que se pueden tratar con anticuerpos o partes de anticuerpos anti-CD40 incluyen, pero no se limitan a, pacientes que se han diagnosticado de cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer ovárico, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de colon, tumores ginecológicos (por ejemplo, sarcomas uterinos, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma del cuello uterino, carcinoma de la vagina o carcinoma de la vulva), cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino (por ejemplo, cáncer de tiroides, paratiroides o glándulas suprarrenales), sarcomas de tejidos blandos, leucemia, mieloma, mieloma múltiple, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, tumores sólidos de la infancia, enfermedad de Hodgkin, linfomas linfocíticos, linfoma no hodgkiniano, cáncer de la vejiga, cáncer de hígado, cáncer renal, cáncer del riñón o del uréter (por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal), o neoplasias del sistema nervioso central (por ejemplo, linfoma primario del SNC, tumores de la médula espinal, gliomas del tronco encefálico o adenomas hipofisarios), glioma o fibrosarcoma.

Como se usa en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un mamífero humano o no humano que expresa un CD40 de reacción cruzada (por ejemplo, un primate, macaco de Java o macaco de la India). Preferentemente, un paciente que se está tratando es humano.

Como se usa en el presente documento, la expresión "régimen de dosificación intermitente" significa un régimen de dosificación que comprende administrar un anticuerpo agonista de CD40, seguido de un periodo de descanso.

Como se usa en el presente documento, la expresión "periodo de descanso" significa un periodo de tiempo durante el que no se le da al paciente un anticuerpo agonista de CD40. Por ejemplo, si el anticuerpo se ha dado sobre una base diaria, habría un periodo de descanso si la administración diaria se interrumpe, por ejemplo, durante algunos días o semanas. Si se administra una dosis en un calendario diferente, se produciría un periodo de descanso cuando se interrumpe la dosificación durante algún tiempo. De forma alternativa, se puede producir un periodo de descanso cuando la concentración del anticuerpo se mantiene en un nivel subterapéutico.

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo no se da después del segundo periodo de descanso, es decir, cuando el procedimiento de la divulgación implica dos ciclos, el fármaco no tiene que administrarse después del segundo ciclo de descanso.

Preferentemente, durante el periodo de descanso, la concentración plasmática del anticuerpo se mantiene en el nivel subterapéutico.

El periodo de dosificación y/o la dosis del anticuerpo pueden ser iguales o diferentes entre ciclos.

El tiempo total de tratamiento (es decir, el número de ciclos para el tratamiento) variará de un paciente a otro en función del juicio médico y los factores propios del paciente a tratar. En general, se administra el tratamiento hasta que se obtiene una respuesta satisfactoria. En ciertos modos de realización de la divulgación, el periodo de tratamiento comprende 2-20, 2-15, 2-10, 2-7, 2-5 ciclos o 2-3 ciclos.

El anticuerpo se puede administrar por cualquier medio deseado, incluyendo, por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intratumoral y transdérmica. En un modo de realización, el anticuerpo contra CD40 se administra por vía intravenosa. En otro, se administra usando un dispositivo de microaguja; dichos dispositivos son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, el dispositivo descrito en el documento WO 03/084598.

Cuando se administra en combinación con un inhibidor de la replicación del ADN, por ejemplo, cisplatino, el anticuerpo se puede administrar antes, durante o después de la administración del inhibidor.

5 En un aspecto, la invención se refiere a una solución acuosa para inyección intravenosa, con el pH de aproximadamente 5,0 a 6,0, preferentemente pH de aproximadamente 5,5. Dicha solución se puede formular con acetato de sodio (trihidrato), ácido acético (glacial), polisorbato 80, cloruro de sodio y agua. Es preferente que la solución de anticuerpo se almacene a temperaturas de refrigeración de entre 2 °C y 8 °C, y no se congele.

10 También se divulgan procedimientos de tratamiento de un tumor en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprenden administrar a dicho paciente una combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo agonista de CD40 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la replicación del ADN, por ejemplo, un derivado de platino. De acuerdo con la presente divulgación, un anticuerpo agonista de CD40 funciona en combinación sinérgica con el compuesto de derivado de platino, especialmente cisplatino, de modo que el efecto antitumoral de la combinación es mayor que el que podría predecirse a partir de la administración de cada compuesto solo.

15 Los derivados de platino son un grupo bien conocido de compuestos que muestran su actividad antitumoral interfiriendo con la replicación del ADN. De acuerdo con la presente divulgación, los derivados de platino se seleccionan del grupo que consiste en cisplatino (cis-diaminodicloroplatino, véase el índice de Merck), carboplatino y oxaliplatino.

La invención se describirá con referencia a los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

20 **Ejemplo 1:** Efectos del anticuerpo sobre células del ganglio linfático de pacientes con cáncer

Se examinaron los efectos de un anticuerpo humano anti-CD40 (21.4.1) sobre células del ganglio linfático obtenidas de pacientes con cáncer estimulados con células tumorales autólogas.

25 Se recogieron células y tumores de ganglios linfáticos de pacientes con carcinoma de células renales, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células de transición de vejiga, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello. Las células de ganglios linfáticos se colocaron en cultivo junto con tumores tratados con colagenasa irradiados (recuperados del mismo paciente) en presencia o ausencia de 21.4.1 (1 µg/ml; 6,7 nM). Se evaluó la proliferación usando 3H-timidina 96 horas después. Se evaluó el número de células productoras de INFγ por ELISPOT, después de la reestimulación.

30 El anticuerpo potenció el número de linfocitos T positivos para INFγ+ en cultivos de células de ganglios linfáticos estimuladas con antígeno tumoral. Además, la proliferación de estas células de ganglios linfáticos en respuesta al antígeno tumoral se potenció 3-4 veces.

El anticuerpo potenció la capacidad de proliferación y de producción de citocinas de las células de ganglios linfáticos obtenidas de pacientes con cáncer cuando se estimularon con el antígeno tumoral.

**Ejemplo 2:** Unión del anticuerpo al receptor Fc

35 Se examinó la unión de un anticuerpo anti-CD40 (21.4.1) a los receptores Fc en leucocitos humanos y de macaco de Java.

40 Estudios de citometría de flujo indicaron que se expresaban los tipos de FcR FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) así como niveles muy bajos de FcγRI (CD64), en leucocitos humanos. Se determinó la unión de 21.4.1 a los receptores Fc (FcR) en leucocitos de sangre periférica humana o de macaco de Java usando <sup>125</sup>I-21.4.1 y un mAb de control de IgG1 humana. Se aislaron leucocitos humanos procedentes de donantes normales o leucocitos de macaco de Java a partir de sangre completa usando gel de plasma y se lavaron a fondo para permitir la disociación de las inmunoglobulinas séricas unidas al receptor. Se usó centrifugación a través de un colchón de sacarosa para separar anticuerpos de séricas a células y libres. Los estudios se realizaron a 4 °C en presencia de azida de sodio para evitar la internalización del receptor.

45 Se sometió a prueba 21.4.1 para determinar la unión específica a FcR usando el anticuerpo compatible con el isotipo de IgG2 humana no marcado en exceso como competidor. La unión específica de <sup>125</sup>I-21.4.1 a FcR en leucocitos humanos (n = 5 donantes) fue de -1,0±8,5 %, y la unión específica a FcR en leucocitos de macaco de Java (n = 4) fue de un 15±13 %. La adición de un exceso de 500 veces de 21.4.1 no marcado, que bloquearía cualquier unión específica de <sup>125</sup>I-21.4.1 a receptores CD40 de leucocitos, así como FcR, demostró una unión específica de un 49 % y un 67 % de <sup>125</sup>I-21.4.1 a receptores CD40 de leucocitos humanos y de macaco de Java, respectivamente (el % de unión específica a CD40 se calculó restando el % de unión a FcR del % total de unión específica). Como control, <sup>125</sup>I-IgG1 demostró consistentemente unión específica a leucocitos humanos y de macaco de Java. La unión específica del anticuerpo de control IgG1 a FcR en leucocitos humanos y de macaco de Java representó un 56 % y un 51 % de la radioactividad unida total, respectivamente.

55 Estos estudios indican que el anticuerpo muestra unión específica mínima a receptores Fc en leucocitos humanos y

de macaco de Java.

**Ejemplo 3:** Ensayo de liberación de citocinas de sangre completa

Se sometió a prueba un anticuerpo anti-CD40 (21.4.1) para determinar su capacidad para inducir la liberación de citocinas a partir de sangre completa humana no estimulada usando un ensayo de sangre completa in vitro que se correlaciona con la inducción de la liberación de citocinas mediada por anticuerpos en seres humanos. Se sometió a prueba 21.4.1 a 1, 10 y 100 µg/ml, junto con una IgG1 murina anti-CD3 humana como control positivo que induce la liberación de citocinas a través de una ruta mediada por Fc, y LPS como segundo control positivo que induce citocinas estimulando macrófagos. Los donantes usados incluyeron individuos que respondían tanto al anticuerpo murino como a LPS (4 donantes), así como individuos que solamente respondieron a LPS (3 donantes). Se cultivó sangre completa heparinizada con 21.4.1 durante 5 horas y se extrajo el plasma y se analizó para determinar el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interferón gamma (INF-γ) e interleucina-6 (IL-6) por ELISA (usando kits disponibles comercialmente). Los cultivos también se incubaron durante 48 horas y se analizaron para determinar la interleucina-1 beta (IL-1β).

No se detectaron citocinas en el plasma de sangre humana cultivada con 1 o 10 µg/ml de 21.4.1. Sólo un donante tratado con 100 µg/ml del anticuerpo mostró niveles bajos pero medibles de dos citocinas (34 pg/ml de TNF-α y 90 pg/ml de IL-6). Este donante posteriormente se volvió a someter a prueba y no mostró inducción detectable de TNF-α ni de IL-6. No hubo elevación de INFγ ni de IL-1β en ninguna de las muestras.

Estos estudios indican que 21.4.1 no induce citocinas inflamatorias en sangre completa humana.

**Ejemplo 4:** Farmacodinámica y farmacocinética del anticuerpo

Se administró un anticuerpo contra CD40 (21.4.1) por vía intravenosa en varias dosis (1 mg/kg n = 4, 3 mg/kg n = 4, 5 mg/kg de n = 2 y 10 mg/kg n = 2) a macacos de Java. Se extrajo sangre heparinizada de los monos en varios puntos temporales pre- y postdosis. La sangre se dividió en alícuotas y se tiñó. Los datos se adquirieron usando un Becton Dickinson FACSCalibur y se analizaron con el programa informático CellQuest. Los resultados se calcularon como incrementos factoriales en la intensidad de fluorescencia media en comparación con los valores predosis.

La expresión de MHC de clase II, que refleja el estado de activación y la capacidad presentadora de antígenos de los linfocitos B, se incrementó de 2,5 a 3 veces en 24 horas después de la dosificación para todas las dosis sometidas a prueba, sin que se observara una clara relación dosis-respuesta. Se evaluó la expresión de CD23, otro marcador de la activación de linfocitos B, en 2 animales a 3 mg/kg, y un animal a 10 mg/kg. La expresión de CD23 se incrementó ≥20 veces 24 horas después de la dosificación sin que se observara un efecto de la dosis. Persistió la regulación por incremento de ambos marcadores de superficie (incremento de ≥2 veces) mientras los niveles de 21.4.1 se mantuvieron por encima de 1 µg /ml, los niveles de CD71 (receptor de transferrina) y la molécula coestimuladora CD86 también mostraron una regulación por incremento moderada, mientras que la expresión de CD80 no cambió significativamente.

El 21.4.1 regula por incremento los marcadores de superficie en linfocitos B de macacos de Java in vivo. La expresión de MHC de clase II y CD23 en células CD20+ se incrementa con el tratamiento, y 1 mg/kg (correspondiente a una C<sub>máx</sub> de ~ 20 µg/ml y una exposición de ≥0,1 µg/ml durante 4 días) parece producir una respuesta farmacodinámica de saturación en linfocitos B de macacos de Java. La duración de esta respuesta fue más larga a dosis más altas.

Se examinaron las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo anti-CD40 (21.4.1) en macacos de Java después de administración intravenosa (i.v.) de una dosis única de 1, 3, 5 o 10 mg/kg. El 21.4.1 se caracterizó por un bajo aclaramiento sistémico (de 0,0133 a 0,0635 ml/min/kg) y un pequeño volumen de distribución en el estado estacionario (de 0,0459 a 0,0757 l/kg), lo que da como resultado una semivida de eliminación media aparente de 0,75 a 2,0 días (tabla 1). La farmacocinética de 21.4.1 parecía ser dependiente de la dosis sobre el intervalo de dosis examinado. Los valores de aclaramiento disminuyeron, en general, con el incremento de la dosis de 1 a 10 mg/kg y la semivida de eliminación media aparente se incrementó de 0,75 días a 1 mg/kg a 2,0 días a 10 mg/kg. El volumen de distribución en el estado estacionario fue similar a diferentes dosis (media de 0,0575 l/kg).

El aclaramiento dependiente de la dosis observado se puede deber, en parte, a la unión de 21.4.1 a los receptores CD40 que se expresan ampliamente en tejidos normales y la posterior internalización y eliminación del complejo de anticuerpo-receptor. El desarrollo de la respuesta de primate anti-anticuerpo humano (PAHA) también puede contribuir al aclaramiento acelerado en algunos monos. Se evaluó la PAHA sólo después de que las concentraciones séricas individuales de 21.4.1 alcanzaran el límite inferior de cuantificación (LLOQ, 0,03 µg /ml) ya que la presencia de 21.4.1 en el suero de prueba interfiere con el ensayo para PAHA. Se detectaron anticuerpos anti-21.4.1 en todos los monos en los grupos de dosis de 3, 5 y 10 mg/kg a los de 14 a 28 días después de la administración del anticuerpo.

Tabla 1

Media (± DE) de los parámetros farmacocinéticos de 21.4.1 en macacos de Java después de una única administración i.v. a 1, 3, 5 y 10 mg/kg					
Dosis (mg/kg)	N/género	CL (ml/min/kg)	Vdss (l/kg)	t <sub>1/2</sub> (día)	ABC <sub>(0-∞)</sub> (µgh/ml)
1	2/sexo	0,0635 ± 0,0245	0,0757 ± 0,0265	0,75 ± 0,21	298 ± 126

3	2/sexo	0,0213 ± 0,0055	0,0459 ± 0,0055	1,4 ± 0,3	2460 ± 600
5	2F	0,0174	0,0488	1,4	4790
10	1/sexo	0,0133	0,0529	2,0	12500

#### Ejemplo 5: Actividad antitumoral del anticuerpo

Se determinó la actividad inhibidora del crecimiento tumoral de un anticuerpo contra CD40 (21.4.1) en ratones beis con IDCG inyectados s.c. con células tumorales solas ( $1 \times 10^7$ ) o con CD humanas ( $1 \times 10^5$ ) y linfocitos T ( $5 \times 10^5$ ) del mismo donante. La proporción de células tumorales a CD y linfocitos T fue de 100:1:5. A menos que se indique lo contrario, los resultados se presentan en términos de tamaño del tumor en  $\text{mm}^2$  en un punto temporal fijo predeterminado (a partir de experimentos cinéticos) para ser el momento en que el crecimiento tumoral en los animales de control alcanzaba un tamaño de 300-400  $\text{mm}^2$  y que ya no fuera humanitario continuar con el experimento. En todos los casos, se administró sólo una inyección de 21.4.1 que tenía un  $T_{1/2}$  de >30 días en ratones beis con IDCG.

#### Ejemplo 5(a): Efectos del anticuerpo sobre tumores humanos CD40(-)

Se examinaron los efectos de un anticuerpo contra CD40 (21.4.1) sobre el crecimiento de tumores CD40(-) (por ejemplo, eritroleucemia y carcinoma de colon). En particular, se eligieron tumores K562 para evaluar la eficacia de 21.4.1 contra un tumor de baja inmunogenicidad (de clase I y II negativo) CD40(-).

A ratones beis con IDCG se les inyectó s.c. el tumor eritroleucémico CD40(-), K562 (ATCC CCL-243) solo o en presencia de linfocitos T y CD de sangre periférica humana. Los animales recibieron una única inyección i.p. de 21.4.1, en el momento de la inyección del tumor o bien 5 días después usando varios niveles de dosis.

Una única inyección i.p. de 21.4.1 dio como resultado la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del tumor K562 cuando estaban presentes células inmunitarias, como se ilustra el día 21 después de la provocación del tumor (figura 1). La cantidad de 21.4.1 para provocar una inhibición de un 50 % del crecimiento tumoral fue de 0,005 mg/kg correspondiente a una concentración sérica  $C_{\text{máx}}$  de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Se observaron resultados similares con el carcinoma de colon CD40(-), Lovo (ATCC CCL-229). Los resultados fueron idénticos cuando se administró 21.4.1 el día 0 o el día +5 con respecto a la provocación del tumor. El crecimiento de estos tumores CD40(-) no se inhibió por 21.4.1 en ausencia de células inmunitarias.

El 21.4.1 evita el crecimiento de tumores CD40(-) cuando están presentes células inmunitarias, lo que sugiere una potenciación de la actividad antitumoral mediada por el sistema inmunitario. Esto se demostró contra un carcinoma de colon y un tumor eritroleucémico. Esta actividad antitumoral también se demostró usando el anticuerpo 3.1.1 para el carcinoma de colon y para el anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88AV97A/3.1.1L-L4M-L83V ( $CI_{50} < 0,01 \text{ mg/kg}$ ) en el tumor eritroleucémico. Por lo tanto, los datos divulgados en el presente documento demuestran que el anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V tiene la actividad *in vivo* del anticuerpo 3.1.1. Estos resultados tumorales *in vivo* apoyan además que, dados los datos *in vitro* similares obtenidos cuando se compararon los dos anticuerpos, el anticuerpo 3.1.1 y el anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V funcionarán de un modo similar *in vivo*. Por lo tanto, los resultados obtenidos usando 3.1.1 se aplican a 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V en este y otros ensayos.

#### Ejemplo 5(b): Efectos del anticuerpo sobre el crecimiento de tumores humanos de mama y de próstata

Se examinaron los efectos de un anticuerpo anti-D40 (21.4.1) sobre la prevención del crecimiento de tumores de mama y de próstata.

Se expusieron ratones beis con IDCG con el tumor de mama humano, BT 474 (ATCC HTB-20), s.c., junto con linfocitos T y CD de sangre periférica humana. Los animales recibieron una única dosis de 21.4.1 (i.p.) en el momento de la inyección del tumor.

Como se muestra en la figura 2, una única inyección de 21.4.1 evitó el crecimiento de células BT 474 en presencia de células inmunitarias. La cantidad de 21.4.1 necesaria para provocar una reducción de un 50 % en el crecimiento tumoral fue de 0,005 mg/kg correspondiente a una concentración sérica  $C_{\text{máx}}$  de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ . Se observaron resultados similares contra la línea celular de cáncer de próstata humano, PC-3 (ATCC CRL-1435). Esto también se demostró usando el anticuerpo 3.1.1 y se puede esperar para 3.1.1 H-A78TV88A- V97A/3 1.1L-L4M-L83V.

El 21.4.1 evita el crecimiento de los tumores humanos de mama y de próstata.

#### Ejemplo 5(c): Efectos antitumorales del anticuerpo sobre tumores CD40(+)

Se estudiaron los efectos de un anticuerpo anti-CD40 (21.4.1) sobre la actividad antitumoral contra tumores CD40(+) y los cambios en la eficacia en presencia y ausencia de células inmunitarias.

A ratones beis con IDCG se les inyectó por vía subcutánea el linfoma de linfocitos B CD40(+) Raji (ATCC CCL-86) (s.c.), seguido de una única dosis de 21.4.1 (i.p.) en el momento de la inyección del tumor. A algunos animales también se les inyectaron linfocitos T y CD humanos. Se evaluó el crecimiento tumoral el día 21.

Como se muestra en la figura 3, la cantidad de 21.4.1 para provocar una inhibición de un 50 % del crecimiento tumoral en ausencia de células inmunitarias fue de 0,02 mg/kg, correspondiente a una concentración sérica  $C_{m\acute{a}x}$  de 0,2  $\mu\text{g/ml}$ . Cuando se coinyectaron células tumorales con células inmunitarias, la cantidad de 21.4.1 necesaria para provocar una inhibición de un 50 % del crecimiento tumoral se redujo 20 veces a 0,001 mg/kg (concentración sérica  $C_{m\acute{a}x} = 0,01$   $\mu\text{g/ml}$ ).

Estos resultados ilustran que 21.4.1 tiene actividad antitumoral directa contra tumores CD40(+). Esta observación también se hizo para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V ( $CI_{50} < 0,01$  mg/kg). Esta actividad antitumoral para el anticuerpo 21.4.1 se potenció cuando estaban presentes células inmunitarias y esto también se demostró con el anticuerpo 3.1.1 y se espera para el anticuerpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V.

**Ejemplo 5(d): Efectos antitumorales del anticuerpo sobre linfoma de linfocitos B**

Se evaluó la capacidad de un anticuerpo anti-CD40 de acuerdo con la invención (21.4.1) de retrasar la mortalidad en un modelo de tumor sistémico CD40(+) usando un linfoma de linfocitos B.

A ratones beis con IDCG se les inyectó i.v. el linfoma de linfocitos B Daudi (ATCC CCL-213). Se administró 21.4.1 como una única inyección (i.p.) en el momento de la inyección del tumor. Se controló la mortalidad durante 58 días.

Como se muestra en la figura 4, una única inyección de 21.4.1 evitó la mortalidad inducida por una línea de células tumorales administrada sistémicamente.

El 21.4.1 retrasa la mortalidad en un modelo de tumor sistémico CD40(+) usando un linfoma de linfocitos B. Esto también se demostró usando 3.1.1 y se esperan resultados similares para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1 L-L4M-L83V.

**Ejemplo 6: Efectos terapéuticos del anticuerpo en combinación con cisplatino**

Se examinaron los efectos terapéuticos de un anticuerpo anti-CD40 (21.4.1) en la prevención del crecimiento de tumores de mama humanos solo y en presencia de cisplatino.

A ratones beis con IDCG se les inyectó s.c. el tumor de mama, BT 474. Se administraron el anticuerpo (1 mg/kg, i.p.) y/o cisplatino (2,5 mg/kg, i.p.) como una única inyección una vez que los tumores alcanzaron un tamaño de 200  $\text{mm}^2$ . Se midió el crecimiento tumoral el día 84 después de la provocación.

Como se muestra en la figura 4, una única inyección de 21.4.1 o cisplatino evitó el crecimiento tumoral. Sin embargo, la combinación de ambos tratamientos dio lugar a una regresión tumoral completa en 7/8 animales.

El 21.4.1 evita el crecimiento tumoral cuando se administra solo una vez que se establecen los tumores y provoca la regresión tumoral cuando se administra en combinación con cisplatino. Esto también se demostró usando el anticuerpo 3.1.1, y es probable para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V también.

**Ejemplo 7: Farmacocinética multidosis del anticuerpo**

En un estudio de dosis múltiples, se administró 21.4.1 por vía intravenosa a macacos de Java (2/sexo/dosis) en dosis de 0,3, 1,0 y 10 mg/kg los días 1, 3, 5, 7 y 9 para un total de 5 dosis. Se extrajo sangre los días 1 y 9 antes de la dosificación y 0,5, 6 y 24 horas después de la dosificación y antes de la dosificación y 0,5 horas después de la dosificación el día 5 para medir las concentraciones de fármaco en suero. La exposición sistémica a 21.4.1, evaluada por la  $C_{m\acute{a}x}$  media y la  $ABC_{(0-24)}$  media, se incrementó con el incremento de la dosis de 0,3 a 10 mg/kg tanto el día 1 como el día 9 (tabla 2). Se observaron exposiciones similares ( $C_{m\acute{a}x}$  media y  $ABC$  media) los días 1 y 9 en los grupos de dosis de 0,3 y 1 mg/kg. En el grupo de dosis de 10 mg/kg, los valores de  $C_{m\acute{a}x}$  media y  $ABC_{(0-24)}$  media se incrementaron 2,6 y 2,8 veces, respectivamente, del día 1 al día 9. No se observaron diferencias relacionadas con el género en la exposición.

Tabla 2

Media ( $\pm$  DE) de los parámetros farmacocinéticos de 21.4.1 en macacos de Java los días 1 y 9 después de administración i.v. en días alternos

Dosis <sup>a</sup> mg/kg	Día	$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$ABC_{(0-24)}$ ( $\mu\text{gh/ml}$ )
0,3	1	4,67 $\pm$ 1,71	1,9 $\pm$ 2,8	47,7 $\pm$ 15,4
	9	7,4 $\pm$ 2,9	0,5 $\pm$ 0,0	55,6 $\pm$ 47,1
1,0	1	28,7 $\pm$ 5,1	0,5 $\pm$ 0,0	387 $\pm$ 59
	9	12,3 $\pm$ 91	1,9 $\pm$ 2,8	219 $\pm$ 151
10	1	226 $\pm$ 29	1,9 $\pm$ 2,8	4130 $\pm$ 600
	9	577 $\pm$ 163	3,3 $\pm$ 3,2	11400 $\pm$ 2100
N = 2/sexo/dosis				

**Ejemplo 8:** Formulación de anticuerpos

El anticuerpo contra CD40 se concentró hasta aproximadamente 11,0 mg/m ± 0,8 mg/ml usando una unidad de ultrafiltración que contenía casetes de peso molecular de corte de 30 kDa. El concentrado después se sometió a diafiltración en acetato de sodio 20 mM/cloruro de sodio 140 mM, tampón de pH 5,5. Se añadió solución de polisorbato 80 al 2 % al producto diafiltrado concentrado hasta alcanzar una concentración final de polisorbato 80 al 0,02 %.

La invención también se refiere a los siguientes aspectos que se definen en los siguientes párrafos numerados:

1. Un procedimiento de tratamiento del cáncer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente de al menos dos ciclos, comprendiendo cada ciclo (a) un periodo de dosificación durante el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo agonista de CD40 a dicho paciente y, después de ello, (b) un periodo de descanso.
2. El procedimiento del párrafo 1, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz produce una concentración plasmática de dicho anticuerpo de 0,01 µg/ml a 10 µg/ml durante al menos tres horas y el periodo de descanso es durante al menos 1 semana.
3. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz produce una concentración plasmática de 0,03 µg/ml a 1,0 µg/ml.
4. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que la cantidad terapéuticamente eficaz mantiene una concentración plasmática de 0,1 µg/ml a 0,3 µg/ml.
5. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo 3.1.1, 3.1.1H- A78T, 3.1.1 H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1H -A78T-V88AV97A/3. 1.1 L-L4M-L83V, 71.2.10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28 1H-D16E, 23.29.1, 24.2.1, 3.1.1 L-L4M-L83V y 23.28.1L-C92A.
6. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que el anticuerpo comprende una CDR o una región variable de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo denominado 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1HA78T- V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5 1, 23 25.1, 23.28.1, 23.28 1H-D16E, 23.29.1, 24. 2.1, 3.1. 1 L-L4M-L83V y 23.28.1L-C92A.
7. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que el anticuerpo se une al mismo epítipo que un anticuerpo contra CD40 seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo denominado 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4ML83V, 31.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1 1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1, 24.2.1, y 23.28.1 L-C92A.
8. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que el anticuerpo compite con un anticuerpo contra CD40 seleccionado del grupo que consiste de un anticuerpo denominado 3.1.1, 3. 1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1, 24.2.1, 3.1.1HA78TV88A- V97A/3.1.1L-L4M-L83V y 23.28.1L-C92A.
9. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 1, en el que el anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 21.4.1, 3.1.1, y 3.1.1 H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M- L83V.
10. Un procedimiento de tratamiento de un tumor en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente de al menos dos ciclos, comprendiendo cada ciclo (a) un periodo de dosificación de 1-5 días durante el que se administran 0,03-3,0 mg/kg/día del anticuerpo y, después de ello, (b) un periodo de descanso de 1 a 8 semanas.
11. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 10, en el que se administran de 0,1 a 1,0 mg/kg/día o de 0,1 a 0,3 mg/kg/día del anticuerpo.
12. Un procedimiento de tratamiento de un tumor en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente una combinación de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo agonista de CD40 y una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la replicación del ADN.
13. Una formulación farmacéutica líquida estable adecuada para administración parenteral, que comprende un anticuerpo agonista de CD40 a un pH de 5,0-6, 0 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, siendo estable dicha formulación durante un periodo de al menos tres meses.
14. La formulación del párrafo 13, que tiene una concentración de dicho anticuerpo contra CD40 de al menos aproximadamente 5 mg/ml.
15. La formulación del párrafo 13, que comprende un anticuerpo anti-CD40, acetato de sodio, cloruro de sodio y

polisorbato 80.

16. La formulación del párrafo 13, en la que dicho anticuerpo anti-CD40 tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 21.4.1, 3.1.1, y 3.1.1H- A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M- L83V.

5 17. Un procedimiento de tratamiento de un tumor en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo en una dosificación de menos de 1 mg/kg en el que la concentración sérica  $C_{m\acute{a}x}$  de dicho anticuerpo en dicho paciente es de menos de 50  $\mu\text{g/ml}$ .

18. El procedimiento del apartado 17, en el que la dosificación está entre 0,1 a 0,3 mg/kg y en el que la concentración sérica  $C_{m\acute{a}x}$  de dicho anticuerpo en dicho paciente está entre 0,5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ .

10 19. Un procedimiento de potenciación de la respuesta inmunitaria en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar a dicho paciente un anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente de al menos dos ciclos, comprendiendo cada ciclo (a) un periodo de dosificación durante el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo agonista de CD40 a dicho paciente y, después de ello, (b) un periodo de descanso.

15 20. El uso de un anticuerpo agonista de CD40, o un fragmento del mismo, para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente en necesidad de dicho tratamiento, administrando a dicho paciente dicho anticuerpo agonista de CD40 o un fragmento del mismo, en el que dicho anticuerpo se administra de acuerdo con un régimen de dosificación intermitente de al menos dos ciclos, comprendiendo cada ciclo (a) un periodo de dosificación durante el que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo agonista de CD40 a dicho paciente y, después de ello, (b) un periodo de descanso.

20

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gladue et al., Ronald P.

<120> FORMULACIÓN DE ANTICUERPO CONTRA CD40 Y PROCEDIMIENTOS

<130> PC32065A

25 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

30 <213> 3.1.1: Humano

<400> 1

ES 2 580 002 T3

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

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

5 <213> 3.1.1: Humano

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

ES 2 580 002 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

<210> 3

<211> 112

5 <212> PRT

<213> 3.1.1: Humano

<400> 3

ES 2 580 002 T3

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

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

5 <213> 3.1.1: Humano

<400> 4

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

<210> 5

10 <211> 126

<212> PRT

<213> 21.4.1: Humano

<400> 5

ES 2 580 002 T3

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

<210> 6

<211> 326

<212> PRT

5 <213> 21.4.1: Humano

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

ES 2 580 002 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 115 120 125  
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 130 135 140  
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn  
 165 170 175  
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp  
 180 185 190  
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro  
 195 200 205  
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 210 215 220  
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
 225 230 235 240  
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 245 250 255  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 260 265 270  
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
 275 280 285  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 290 295 300  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

ES 2 580 002 T3

<213> 21.4.1: Humano

<400> 7

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

<210> 8

5 <211> 107

<212> PRT

<213> 21.4.1: Humano

<400> 8

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

10

<210> 9

<211> 126

<212> PRT

<213> Humano: 3.1.1H-A78T-V88A-V97A

15 <400> 9

ES 2 580 002 T3

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

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Humano: 3.1.1L-L4M-L.83V

<400> 10

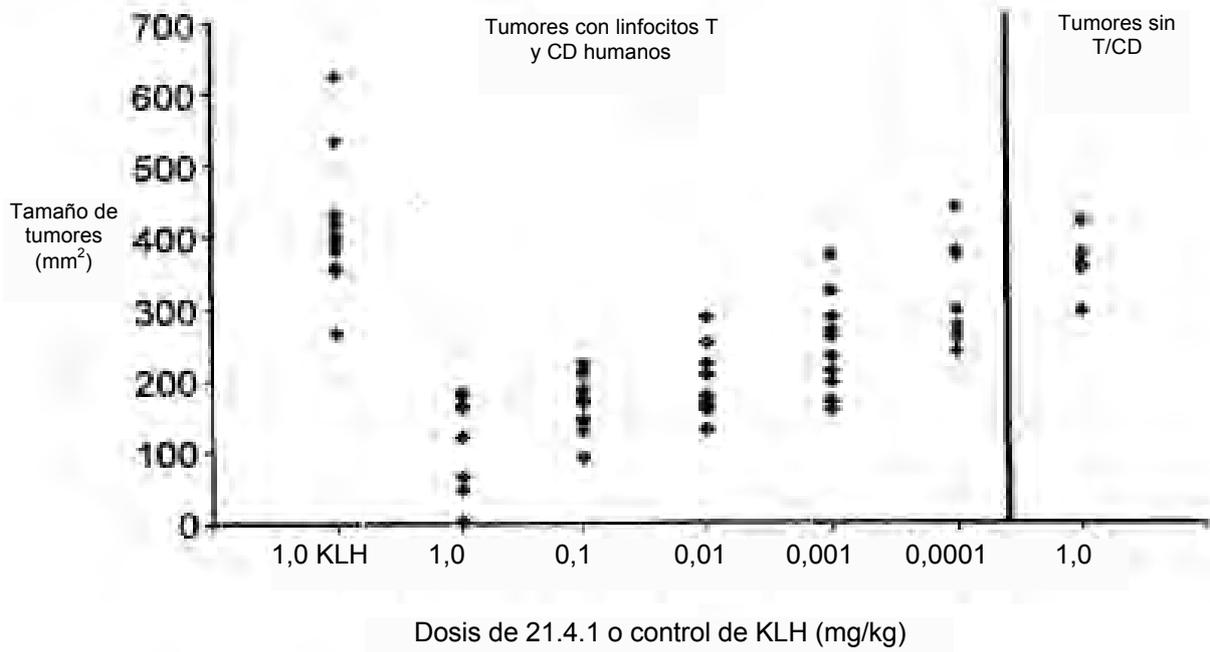
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Tyr Asn Phe Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro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

**REIVINDICACIONES**

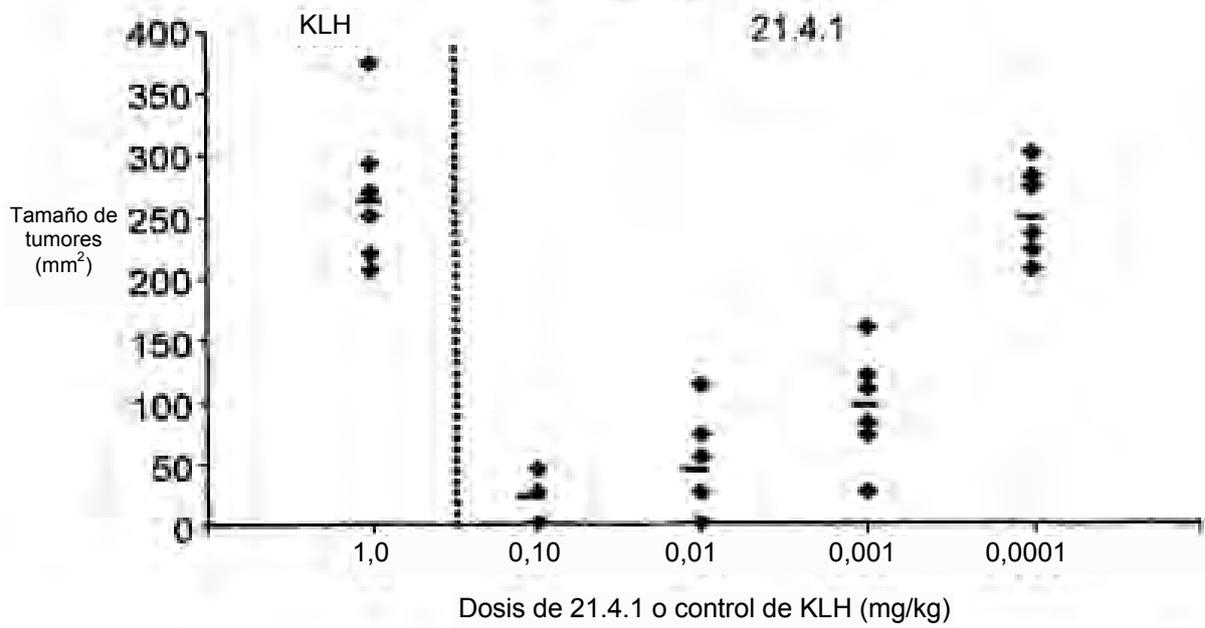
- 5 1. Una formulación farmacéutica líquida adecuada para administración parenteral, que comprende un anticuerpo agonista de CD40 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que la formulación está a pH 5,5, en la que el anticuerpo consiste en el anticuerpo 21.4.1, y en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende acetato de sodio, cloruro de sodio y polisorbato 80.
2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de dicho anticuerpo contra CD40 es de al menos 5 mg/ml.
3. La formulación de la reivindicación 2, en la que la cantidad de acetato de sodio es 20 mM, la cantidad de cloruro de sodio es 140 mM, y la cantidad de polisorbato 80 es de 0,2 mg/ml.

10

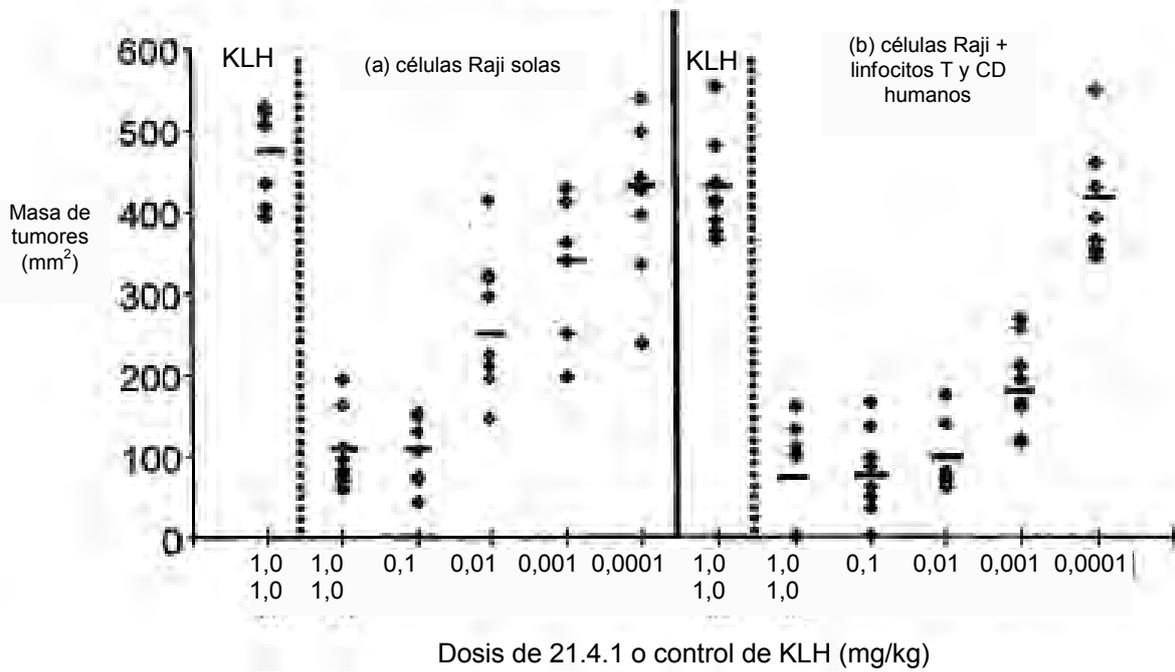
**FIG. 1**



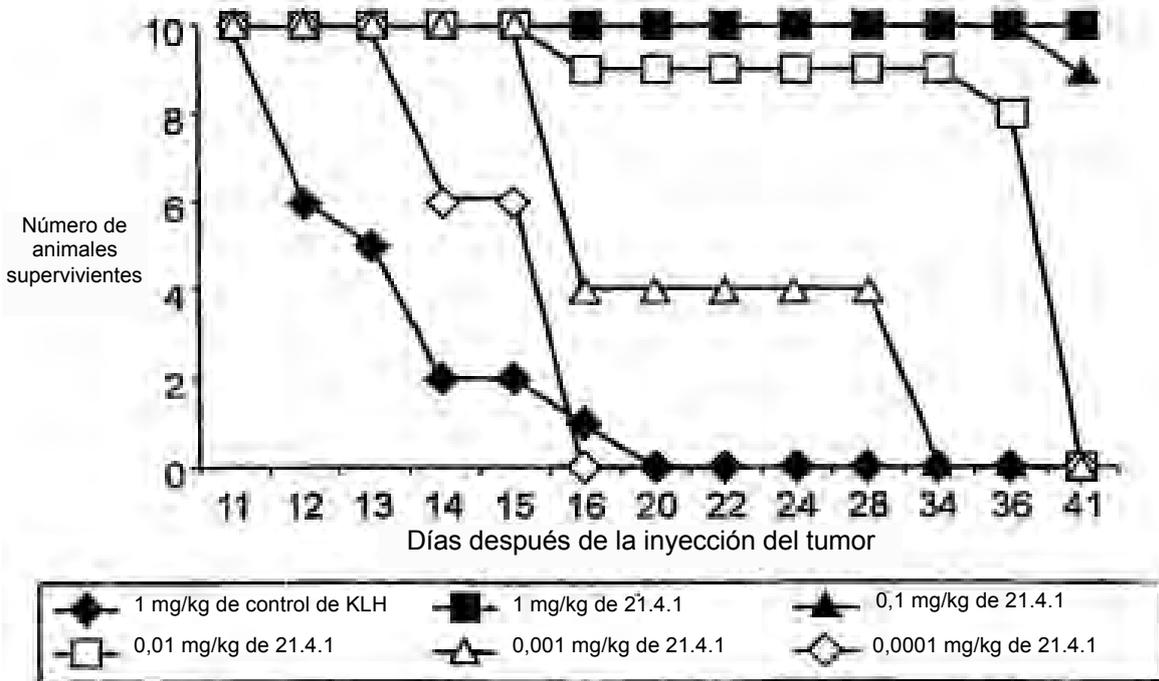
**FIG. 2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**



**FIG. 5**

