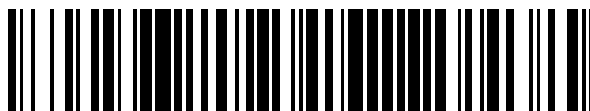


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 157**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2012** **PCT/GB2012/052179**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013** **WO13034904**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2012** **E 12761786 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017** **EP 2753646**

54 Título: **Anticuerpos anti-CD40, usos y métodos**

30 Prioridad:

05.09.2011 GB 201115280

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

08.03.2018

73 Titular/es:

ALLIGATOR BIOSCIENCE AB (100.0%)
Medicon Village, Scheelevägen 2
223 70 Lund, SE

72 Inventor/es:

ELLMARK, PETER BO JOAKIM y
DAHLEN, EVA MARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 658 157 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

Anticuerpos anti-CD40, usos y métodos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos basados en anticuerpos con especificidad de unión por CD40 que presentan una mejor afinidad y/o potencia agonista, que son útiles en el tratamiento de enfermedades como el cáncer. La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas, usos, métodos y kits que comprenden dichos anticuerpos.

Introducción

El cáncer supone más del 30 % de las muertes en los países desarrollados, Mientras que se ha conseguido un gran progreso en el tratamiento de ciertos tumores (enfermedad de Hodgkin, algunos linfomas/leucemias, cánceres cutáneos localizados), las terapias convencionales tales como la cirugía, quimioterapia y radioterapia a menudo son ineficaces para curar tumores sólidos diseminados.

La inmunoterapia (sinónimo de terapia biológica) del cáncer se mantiene como una gran promesa para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo los tumores metastáticos diseminados (Stagg et al., 2007, Immunol Rev. 220: 82-101; Melief, 2008, Immunity, 29: 372-383, Melero et al., 2007, Nat Rev Cancer, 7: 95-106; Waldmann, 2006, Annu. Rev Med. 57: 65-81; Khawli et al., 2008, Handb. Exp. Pharmacol. 181: 291-328; Berinstein, 2007, Vaccine, 25 Suppl 2: B72-B88; Mellor y Munn, 2008, Nat Rev Immunol. 8: 74-80). Ayuda a reclutar el sistema inmunitario del propio paciente para luchar contra el cáncer y generar una erradicación de las células tumorales a largo plazo.

Se han desarrollado varias estrategias diferentes para la inmunoterapia del cáncer, incluyendo las siguientes:

(1) La terapia con anticuerpos monoclonales (Mab) se pueden utilizar para: i) dirigirse a las células cancerosas para su destrucción, bien utilizando los anticuerpos desnudos o conjugados a una toxina (por ejemplo, Rituximab); y/o ii) bloquear factores de crecimiento (por ejemplo, el Herceptin®); y/o iii) estimular el sistema inmunitario.

(2) Vacunas para el cáncer, que incluye vacunas de células tumorales (autólogas o alogénicas), vacunas antigénicas y vacuna de células dendríticas, vacunas de ADN, y vacunas basadas en un vector (por ejemplo, transferencia genética basada en adenovirus).

(3) Inmunoterapias no específicas y adyuvantes, que actúan estimulando el sistema inmunitario más generalmente y por lo tanto, activar las células inmunitarias específicas del tumor que se han suprimido por el ambiente del tumor. Esto se puede hacer bien estimulando las células inmunitarias efectoras que dan lugar a una reacción inmunitaria contra el tumor (por ejemplo, las células T efectoras o células T_{eff}) o inhibiendo o inactivando célula con un fenotipo inhibidor (por ejemplo, células T reguladoras, o células T_{reg}). Una estrategia como esta incluirá moléculas activas tales como las citocinas, adyuvantes bacterianos así como fármacos (incluyendo mAb) que se dirigen a receptores inmunorreguladores (por ejemplo, CTLA-4 y CD40). Las estrategias adicionales incluyen la transferencia de células T adoptivas y las terapias de agotamiento de células T_{reg} , que se encuentran de alguna manera entre los dos últimos grupos.

CD40 es una glicoproteína que se expresa en la superficie celular, que pertenece a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y tiene un papel central en el sistema inmunitario. Se expresa en varias células inmunitarias, tales como las células B, células dendríticas, monocitos, y macrófagos. Las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) están activadas cuando se produce la señalización mediante la CD40 (revisado por Schonbeck y Libby, 2001, Cell Mol Life Sci, 58(1): 4-43).

El ligando natural de CD40, denominado CD154 o CD40L, se expresa principalmente en linfocitos T maduros (Armitage et al., 1992, Nature, 357: 80-82; Schonbeck et al., 2001, Cell Mol Life Sci., 58,40-43; van Kooten et al., 2000, J. Leuk. Biol., 67: 2-17; Quezada et al., 2004, Annu. Rev. Immunol., 22: 3077-328). La señalización mediada por el CD40L desencadena muchos eventos biológicos, incluyendo la activación celular inmunitaria, proliferación, y producción de citocinas y quimiocinas (Schonbeck et al., 2001, Cell Mol Life Sci., 58: 40-43; van Kooten et al., 2000, J. Leuk., Biol., 67: 2-17).

La señalización CD40 es crítica para las respuestas inmunitarias dependientes de células T y dependientes de célula B, y los pacientes con CD40 o CD40L no funcionales están marcadamente inmunosuprimidos (Foy et al., 1993, J Exp Med 5: 1567-1575; Siepmann et al., 2001, Immunology 3: 263-272; Allen et al., 1993, Science, 259: 990-993). La estimulación de las células presentadoras de antígenos, tales como las células B y células dendríticas humanas con el CD40L recombinante o anticuerpos anti-CD40 induce la regulación positiva de marcadores de superficie tales como CD23, CD80, CD86, Fas y MHC II, y la secreción de citocinas solubles, por ejemplo, IL-12,

TNF- γ y TNF- α (van Kooten et al., 2000, J Leucoc Biol, 67: 2-17; Schonbeck et al., 2001, supra). En un cuadro tumoral, las células dendríticas estimuladas por CD40 pueden activar las células efectoras específicas del tumor, que tienen el potencial de erradicar las células tumorales (van Kooten et al., 2000, J Leucoc Biol, 67: 2-17; Sotomayor et al., 1999, Nature Medicine, 5: 780-787).

La expresión de CD40 se produce en muchas células normales y células tumorales. Por ejemplo, todas los linfomas B y del 30 % al 70 % de los tumores sólidos tienen expresión de CD40. Está bien establecido que la activación de CD40 es eficaz para desencadenar respuestas anti-tumorales (van Kooten et al., 2000, J Leucoc Biol, 67: 2-17; Sotomayor et al., 1999, Nature Medicine, 5: 780-787). El efecto de la activación de CD40, que contribuye a la alteración del crecimiento tumoral, implica al menos mecanismos de, activación inmunitaria que produce una respuesta de células T específicas del tumor, un efecto apoptótico directo en los tumores positivos a CD40 y la estimulación de una respuesta humoral que da lugar a ADCC. El efecto anti-tumoral de la activación por CD40 también se ha expuesto en tumores negativos a CD40 (Tutt et al., 2002, J Immunol., 168 (6): 2720-8; van Mierlo et al., 2002, Proc Natl Acad Sci, USA, 99(8): 5561-6). Aquí, la erradicación tumoral observada estaba fuertemente conectada con la aparición de linfocitos T citotóxicos específicos del tumor, CTL.

Se han propuesto adyuvantes de vacunas de cáncer que implican la estimulación por CD40. Se ha demostrado una prueba-del-concepto pre-clínica por anticuerpos agonistas de CD40 para varias formas de cáncer (Kalbashi et al., 2010, J Immunotherapy, 33: 810-816; Loskog et al., 2009, Semin Immunology, 21: 301-307; French et al., 1999, Nature Medicine, 548-553; Sotomayor et al., 1999, Nature Medicine, 5: 780-787; Staveley et al., 2003, Nature Medicine, 171: 697-707). También se han llevado a cabo estudios clínicos para anticuerpos agonistas de CD40, incluyendo el SGN-40 (un anticuerpo humanizado que tiene propiedades agonistas parciales y débiles) y CP-870.893 (un anticuerpo monoclonal agonista completamente humano y selectivo de CD40) (Khalil y Vonderheide, 2007, Update on Cancer Therapeutics, 2: 61-65; Hussein et al., 2010, Haematologica, 95: 845-848).

El documento WO 2006/073443 desvela composiciones y métodos para inhibir las actividades dirigidas por CD40, que están mediadas por medio de la unión de C4BP a CD40. Las composiciones desveladas en el documento incluyen anticuerpos anti-CD40, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se ha establecido que tienen las siguientes características : 1) están libres de actividad agonista de CD40 significativa cuando se unen al antígeno CD40; y 2) son capaces de unirse específicamente al antígeno CD40 que se expresa en la superficie de las células, en el que esta unión al antígeno CD40 bloquea la señalización de CD40 mediada por C4BP, inhibiendo de esta manera una o más actividades dirigidas por CD40. Los anticuerpos antagonistas anti-CD40 del documento WO 2006/073443 se utilizan para tratar enfermedades asociadas al CD40 que están mediadas por la estimulación por C4BP de la señalización de CD40, incluyendo cánceres, tales como cánceres relacionados con células B y tumores sólidos, y enfermedades o trastornos que tienen un componente autoinmunitario y/o inflamatorio, incluyendo el rechazo de trasplante de tejidos y órganos.

Sin embargo, la administración sistémica de anticuerpos CD40 se ha asociado con efectos secundarios adversos, tales como síndrome de ictus, y síndrome de liberación de citocinas (van Mierlo et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 5561-5566; van Mierlo et al., 2004, J Immunol 173: 6753-6759).

A la luz de lo anterior, sigue existiendo la necesidad de terapias antitumorales mejoradas, particularmente de anticuerpos anti-CD40 agonistas adecuados para su uso clínico.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo con especificidad de unión multivalente por el CD40, que comprende CDR como se definen en el presente documento, que mantienen la especificidad de unión multivalente por el CD40, en el que la potencia del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, para la activación de células dendríticas es mayor, o es igual a su potencia para la activación de células B y en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tiene una afinidad (KD) para CD40 de menos de 1×10^{-10} M (es decir, 0,1 nM).

De manera alternativa, o además, el primer aspecto de la invención proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo con especificidad de unión multivalente para el CD40, que mantenga la especificidad de unión multivalente para CD40, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, es capaz de ejercer efectos citotóxicos duales en células tumorales CD40⁺ (preferentemente *in vivo*). Por "efectos citotóxicos duales" los inventores incluyen un efecto apoptótico directo sobre las células tumorales y un efecto citotóxico mediado por células inmunitarias indirectas (por ejemplo, ADCC) sobre las células tumorales.

Por "potencia", con respecto a la activación de células dendríticas y activación de células B, los inventores quieren decir la CE50 para dicha activación celular por el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, o fusión, variante o derivado del mismo. Los expertos en la técnica apreciarán que la potencia para la activación de células dendríticas y la activación de células B se puede medir por diferentes métodos, incluyendo pero sin limitarse a los métodos descritos en los Ejemplos posteriormente.

En una realización, la activación de células dendríticas se define en referencia a una CE50 para la estimulación de la expresión de CD80 medida por el análisis FACS (tal como en el Ejemplo 4) y la activación de células B se define en referencia a una EC50 para la proliferación de las células B (tal como en el Ejemplo 6).

Se sabe que el anticuerpo anti-CD40 desarrollado por Pfizer, CP-870.893, tiene aproximadamente 20 veces más potencias para la activación de células B que para la activación de células dendríticas (Gladue et al., 2011, Cancer Immunol Immunotherapy (7), 1009-1017). También se ha demostrado que uno de los efectos farmacodinámicos principales del tratamiento con el CP-870.893 es una disminución rápida de las células B entre los linfocitos de sangre periférica (Vonderheide et al., 2007, Journal of Clinical Oncology 25, 7, 876-883). El efecto sobre las células B puede dar como resultado toxicidad que limita la dosis a una dosis de tratamiento que sea insuficiente para activar células dendríticas. Los presentes inventores creen que la activación de células dendríticas tiene más relevancia clínica que la activación de células B. La terapia del cáncer con agonistas de CD40 está unida firmemente a la activación de células T (French et al., 1999, Nature Medicine, 548-553; van Kooten et al., 2000, J Leucoc Biol, 67: 2-17; Sotomayor et al., 1999, Nature Medicine, 5: 780-787), y esta activación de células T depende de la activación de células presentadoras de antígeno profesionales, en particular las células dendríticas (Melief et al., 2000, 75: 235-282).

Los presentes inventores han desarrollado clones de anticuerpos anti-CD40 agonistas que tienen una capacidad mejorada para activar células dendríticas.

En una realización, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención tienen una potencia para la activación de las células dendríticas que es mayor, o igual a, su potencia para la actividad de células B. O, dicho de otra manera, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención tienen una potencia para la activación de células B que es menor, o igual a la de activación de células dendríticas que es mayor o igual a su potencia para la activación de células dendríticas.

Por "especificidad de unión" los inventores incluyen la capacidad del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno de la invención para unirse al menos 10 veces más fuertemente al CD40 que a cualquier otro polipéptido; preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, de la invención se une selectivamente a CD40 en condiciones fisiológicas (por ejemplo, *in vivo*; y por ejemplo, cuando el CD40 está presente en la superficie celular).

Por "multivalente" los inventores incluyen que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención comprende dos o más sitios de unión al antígeno con especificidad por CD40. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender dos o tres o cuatro o cinco o seis o más de dichos sitios de unión al antígeno. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG bivalente intacto.

El CD40 es una glicoproteína que se expresa en la superficie celular que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFR) y tiene un papel central en el sistema inmunitario. Se expresa en varias células inmunitarias tales como células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos y APC profesionales, que se activan cuando se produce la señalización mediante el CD40 (revisado por Tasci et al., 2001, Cell. Mol. Life Sci., (58), 4-43). La expresión de CD4 se produce en muchas células normales y células tumorales, tales como de linfomas B, tumores sólidos, melanomas y carcinomas. Está bien establecido que la activación de CD40 es eficaz para desencadenar respuestas anti-tumorales, y la activación de CD40 contribuye a la alteración del crecimiento tumoral al menos por los mecanismos de activación inmunitaria, un efecto apoptótico directo en los tumores positivos a CD40 y la estimulación de una respuesta humoral que da lugar a la ADCC y CDC.

La existencia de ADCC y CDC depende de la interacción del sistema inmunitario del huésped con la parte Fc del anticuerpo, que se determina por el dominio constante de la cadena pesada. De los dominios constantes de origen natural, el gamma 1 es el isotipo que evoca más eficazmente ADCC y CDC (Janeway's Immunobiology, 2008, 7ª edición, Garland Science). En consecuencia, el Fc preferido para los anticuerpos de la invención es un Fc gamma1, que hace del anticuerpo anti-CD40 un isotipo IgG1. También sería posible aumentar adicionalmente estos efectos utilizando varios métodos conocidos, tal como modificación de Fc (mutaciones puntuales) y modificaciones de glicanos (revisado por Carter, Nature Reviews Immunology, 2006 (6), 343-357).

El mecanismo por el que los anticuerpos activan el CD40 en las células dendríticas y células B depende de ambos epítopos en el CD40 a los cuales se une y en la multimerización del receptor. La dimerización del receptor de CD40 por el anticuerpo bivalente a modo de ejemplo (IgG1) de la invención es ventajosa por su efecto agonista.

Por "CD40" los inventores incluyen cualquier proteína natural o sintética con identidad estructural y/o funcional con la proteína CD40 humana como se define en el presente documento y/o variantes de la misma.

Preferentemente, el CD40 es el CD40 humano, tal como el N° de registro Uniprot P25942 y el N° de registro en GenBank AAH12419.

Sin embargo, los expertos habituados en la técnica apreciarán que el CD40 puede ser de cualquier mamífero tal como un mamífero doméstico (preferentemente con significación agrícola o comercial incluyendo, un caballo, cerdo, vaca, oveja, perro y gato). Por "proteína de mamífero" los inventores incluyen cualquier proteína que ese encuentra en, se deriva de, y/o se aísla de, una o más células de un mamífero; por ejemplo, la expresión "proteína humana" incluye una proteína que se encuentra en, se deriva de, y/o se aísla de una o más células de un ser humano.

Como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno, de la invención son capaces de activar las células B y las células dendríticas.

Las APC profesionales, tales como las células dendríticas se activan cuando se produce la señalización mediante el CD40, que desencadena varios eventos biológicos, incluyendo la activación celular inmunitaria, la proliferación, y la producción de citocinas y quimiocinas. Los métodos para determinar la activación de células dendríticas asociada con CD40 se conocen en la técnica (que se trata por ejemplo, en Schonbeck et al., 2001, *Cell Mol Life Sci.*, 58: 40-43; van Kooten et al., 2000, *J. Leuk., Biol.*, 67: 2-17) y se describen en los Ejemplos adjuntos.

La estimulación de células B humanas con CD40L recombinante o anticuerpos anti-CD40 induce la regulación positivo de los marcadores de superficie, tales como CD23, CD30, CD80, Fas, y MHC II, secreción de citocinas solubles, por ejemplo IL-6, TNF- γ y TNF- α , y agregación homeotípica. Los métodos para determinar la activación de células B relacionada con CD40 se conocen en la técnica (expuesto, por ejemplo, en Schonbeck et al., 2001, *supra*) y se describen en los Ejemplos adjuntos.

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención se han optimizado con el fin de proporcionar una mejora de la potencia para la activación de las células dendríticas. En una realización, la potencia para la activación de células dendríticas aumenta selectivamente con respecto a la potencia para la activación de células B.

Los métodos y ensayos para determinar la potencia de un anticuerpo para la activación de células dendríticas y células B se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, la activación de células dendríticas puede evaluarse midiendo la regulación positiva de los marcadores de superficie celular tal como CD86 y CD80 (véase el Ejemplo 3) y/o midiendo la secreción de TNF- γ por las células T inducida por el anticuerpo anti-CD40 (véase el Ejemplo 4 posteriormente).

De igual manera, la activación de células B se pueden evaluar midiendo la regulación positiva de los marcadores de superficie celular (tal como CD 86, véase Gladue et al., 2011, *supra.*) y/o midiendo a proliferación de células B inducida por el anticuerpo anti-CD40 (véase el Ejemplo 6 posteriormente).

Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención activan las células dendríticas al menos tan potentemente como activan las células B (por ejemplo, como se determina por la medición de la regulación positiva de CD80 y/o CD86 en ellas). Por lo tanto, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de la invención pueden tener dos veces más potencia para la activación de células dendríticas frente a células B, por ejemplo, al menos tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces, siete veces, ocho veces, nueve veces, diez veces o incluso más potencia para la activación de las células dendríticas.

Por "anticuerpos" los inventores incluyen moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas, así como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en los que al menos un aminoácido está mutado con respecto a los anticuerpos humanos de origen natural), anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y ligeras, y fragmentos de unión al antígeno y derivados de los mismos. El término también incluye moléculas tipo anticuerpo que se pueden producir utilizando técnicas de fagos de presentación u otras técnicas de selección aleatoria de moléculas. El término también incluye todas las clases de anticuerpos, incluyendo: IgG, IgA, IgM, IgD y IgE. Como se expone adicionalmente posteriormente, también se incluyen en la invención fragmentos tales como Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos del mismo que mantienen el sitio de unión al antígeno. De manera similar, el término "anticuerpo" incluye derivados modificados genéticamente de anticuerpos tales como moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de único dominio (dAb). Dichos fragmentos y derivados se pueden hacer multivalentes para CD40 por multimerización, por ejemplo, dímeros scFv-scFv, o dAb-dAb. Los dominios variables de cadena pesada (V_H) y variable de cadena ligera (V_L) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento del antígeno, un hecho que se reconoció por primera vez por los experimentos tempranos de digestión por proteasas. La confirmación adicional se descubrió por la "humanización" de anticuerpos de roedores. Los dominios variables de origen de roedor se pueden fusionar con dominios constantes de origen humano de manera que el anticuerpo resultante mantiene la especificidad antigénica del anticuerpo parental de roedor (Morrison et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855).

También se describen en el presente documento variantes, fusiones y derivados de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la invención, así como fusiones de dichas variantes o derivados, proporcionando dichas variantes, fusiones y derivados que tienen la especificidad para CD40 y una potencia para la activación de células dendríticas que es mayor, o igual que, la potencia para la activación de células B.

Como anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos se pueden fabricar uno o más componentes polipeptídicos variantes adecuadas, fusiones y derivados del anticuerpo y fragmento de unión al antígeno de los mismos como se definen en el presente documento utilizando métodos de modificación proteica y mutagénesis dirigida al sitio bien conocidos en la técnica utilizando los polinucleótidos recombinantes (véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3ª edición, Sambrook & Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Por lo tanto, se pueden fabricar variantes, fusiones y derivados de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se ha definido en el presente documento, basándose en el componente polipeptídico del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo.

Por "fusión" los inventores incluyen dicho polipéptido fusionado con otro polipéptido. Por ejemplo, dicho polipéptido se puede fusionar a un polipéptido tal como la glutatión-S-transferasa (GST) o la proteína A con el fin de facilitar la purificación de dicho polipéptidos. Ejemplos de dichas fusiones son bien conocidas por los expertos en la técnica. De manera similar, dicho polipéptido se puede fusionar a un marcador oligo-histidina tal como His6 o a un epítipo reconocido por un anticuerpo tal como el epítipo marcador Myc. Las fusiones de cualquier variante o derivado de dicho polipéptido también están incluidas en el alcance de la invención.

La fusión puede comprender o consistir en una porción adicional que confiere una característica deseable en dicho polipéptido, por ejemplo, la porción puede ser útil para detectar o aislar el polipéptido, o promover la captación celular del polipéptido. La porción puede ser, por ejemplo, un resto de biotina, un resto radioactivo, un resto fluorescente, por ejemplo, un fluoróforo pequeño o un fluoróforo de proteína fluorescente verde (GFP), como conocen bien los expertos en la técnica. El resto puede ser un marcador inmunogénico, por ejemplo un marcador Myc, como conocen los expertos en la técnica o puede ser una molécula lipófila o domino polipeptídico que es capaz de promover la captación celular del polipéptido, como conocen los expertos en la técnica.

Por "variantes" de dicho polipéptido los inventores incluyen inserciones, eliminaciones, y sustituciones, sean conservadoras o no conservadoras. En particular los inventores incluyen variantes del polipéptido en el que dichos cambios no alteran sustancialmente la actividad de dicho polipéptido. Las variantes pueden incluir, por ejemplo, variantes alélicas que variarán normalmente de la secuencia determinada en solo uno o dos o tres, y normalmente no más de 10 o 20 restos de aminoácidos. Normalmente, las variantes tienen sustituciones conservadoras.

La variante polipeptídica puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad con una o más de las secuencias de aminoácidos que se dan anteriormente, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con una o más de las secuencias especificadas en el presente documento.

Por ejemplo, las variantes de los polipéptidos definidas en el presente documento incluyen los polipéptidos que comprenden una secuencia con al menos un 60 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que comprende: SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 27; y SEQ ID NO: 28; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; y SEQ ID NO: 39; y es preferentemente al menos un 70 % u 80 % u 85 % o 90 % de identidad condicha secuencia, y más preferentemente al menos un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con dicha secuencia.

El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, por el programa LALIGN (Huang y Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12: 337-357) en el sitio de instalación Expasy (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) utilizando los parámetros de la opción de alineamiento global, la matriz de valoración BLOSUM62, falta de hueco abierto -14, falta de hueco extendido -4. De manera alternativa, el porcentaje de secuencia entre dos polipéptidos se puede determinar utilizando programas de computadora adecuados por ejemplo el programa GAP del Grupo de Computación Genética de la Universidad de Wisconsin y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuyas secuencias se han alineado óptimamente.

El alineamiento se puede llevar a cabo de manera alternativa utilizando el programa Clustal W (como se describe en Thompson et al., 1994, Nucl. Acid Res. 22: 4673-4680). Los parámetros que se utilizan pueden ser los siguientes:

- Parámetros de alineamiento rápido por parejas: Tamaño K-tuple (palabra; 1, tamaño de ventana; 5, penalización por hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de valoración: x por ciento.
- Parámetros de alineamiento múltiple: penalización por hueco abierto; 10, penalización por extensión de hueco; 0,05.
- Matriz de valoración: BLOSUM.

De manera alternativa, se puede utilizar el programa BESTFIT para determinar los alineamientos locales de secuencias.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención puede comprender o consistir en uno o más aminoácidos que se han modificado o derivado.

Los derivados químicos de uno o más aminoácidos se pueden conseguir por la reacción con un grupo funcional lateral. Dichas moléculas derivadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que se han derivado grupos amino libres que se han derivado para formar hidroclouros de amina, grupos sulfonil p-tolueno, grupos carboxibenzoxi, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupo formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivarse para formar sales, metil y etil ésteres u otros tipos de ésteres de hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivar

para formar derivados O-acilo u O-alquilo. También se incluyen como derivados químicos los péptidos que contienen derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: se puede sustituir la 4-hidroxiprolina por prolina; la 5 hidroxilisina se puede sustituir por lisina; 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; la homoserina se puede sustituir por serina y la ornitina por lisina. Los derivados también

- 5 incluyen péptidos que contienen una o más adiciones o eliminaciones a condición de que se mantenga la actividad requisito. Otras modificaciones incluidas son la amidación, la acilación del extremo amino (por ejemplo, la acetilación o amidación con ácido tioglicólico, carboxilamidación terminal (por ejemplo, con amoniaco o metilamina) y modificaciones terminales similares.
- 10 Será apreciado por los expertos en la técnica que también pueden ser útiles los compuestos péptidomiméticos. El término 'peptidomimético' se refiere a un compuesto que imita la conformación y características deseables de un péptido particular como agente terapéutico.

- 15 Por ejemplo, dicho polipéptido incluye no solo las moléculas en las que se unen restos de aminoácidos por enlaces peptídicos (-CO-NH-) sino también moléculas en las que se revierte el enlace peptídico. Dichos péptidos retro-invertidos se puede fabricar utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los que se describen en Meziere et al. (1997) J. Immunol. 159, 3230-3237. Esta estrategia implica la fabricación de pseudo-péptidos que contienen cambios que implican la matriz, y no la orientación de las cadenas laterales. Los péptidos retro-invertidos, que contienen enlaces NH-CO en vez de enlaces peptídicos CO-NH, son mucho más resistentes a
- 20 la proteólisis. De manera alternativa, dicho polipéptido puede ser un compuesto peptidomimético en el que uno o más de los restos de aminoácidos están unidos por un enlace - γ (CH₂NH) en lugar del enlace amida convencional.

- En una alternativa adicional, el enlace peptídico puede dispensarse junto con un resto enlazador apropiado que mantiene el espacio entre átomos de carbono de los restos de aminoácidos; puede ser ventajoso que el resto enlazador tenga la misma distribución de carga y sustancialmente la misma planitud que el enlace peptídico.
- 25

Se apreciará que dicho polipéptido puede bloquearse convenientemente en su extremo N- o C- de manera que ayude a reducir la susceptibilidad de la digestión exo-proteolítica.

- 30 Varios aminoácidos no codificados no codificados tales como los D-aminoácidos y los N-metil aminoácidos también se han utilizado para modificar los péptidos de mamífero. Además, se puede estabilizar una conformación que se presume bioactivo por una modificación covalente, tal como la ciclación o por la incorporación de lactamos u otros tipos de puentes, por ejemplo, véase Veber et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2636 y Thursell et al., 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 166.

- 35 Un tema común entre muchas de las estrategias sintéticas ha sido la introducción de algún resto cíclico en una matriz basada en un péptido. El resto cíclico restringe el espacio conformacional de la estructura del péptido y esto resulta frecuentemente en un aumento de la especificidad del péptido para un receptor biológico particular. Una ventaja añadida de esta estrategia es que la introducción de un resto cíclico en un péptido también puede resultar en
- 40 el péptido que tiene una disminución de la sensibilidad las peptidasas celulares.

- Por lo tanto, los polipéptidos a modo de ejemplo comprenden o consisten en aminoácidos de cisteína terminales. Dicho polipéptido puede existir en una forma cíclica heterodética por la formación de enlace disulfuro de los grupos mercaptido en los aminoácido de cisteína terminales o en una forma homodética por la formación de enlaces
- 45 peptídicos amida entre los aminoácidos terminales. Como se ha indicado anteriormente, la ciclación de péptidos pequeños mediante enlaces disulfuro o amida entre las cisteínas del extremo N y C puede sortear los problemas de especificidad y semivida que se observan a veces con los péptidos lineales, disminuyendo la proteólisis y también aumentando la rigidez de la estructura, que puede dar lugar a compuestos con alta especificidad. Los polipéptidos ciclados por enlaces disulfuro tienen extremos amino y carboxilo que siguen siendo susceptibles a la degradación
- 50 proteolítica, mientras que los péptidos ciclados por la formación de un enlace amida entre la amina del extremo N y el carboxilo del extremo C y por lo tanto que no contenga más extremos amino o carboxilo libres. Por lo tanto, los péptidos se pueden unir por un enlace C-N o por un enlace disulfuro.

- La presente divulgación no se limita de ninguna manera por el método de ciclación de péptidos, sino que engloba péptidos cuya estructura cíclica se puede conseguir por cualquier método adecuado de síntesis. Por lo tanto, los enlaces heterodéticos pueden incluir, pero no se limitan a la formación mediante puentes disulfuro, alquilenos o
- 55 sulfuro. Los métodos de síntesis de péptidos cíclicos homodéticos y péptidos cíclicos heterodéticos, que incluyen puentes disulfuro, sulfuro y alquilenos, se desvelan en el documento US 5.643.872. Otros ejemplos de los métodos de ciclación se exponen y desvelan en el documento US 6.008.058.

- 60 Una estrategia adicional para la síntesis de compuestos péptidomiméticos cíclicos péptidomiméticos en la metátesis anular cerrada (RCM) Este método implica las etapas de síntesis de un precursor peptídico y ponerlo en contacto con un catalizador RCM para dar lugar a un péptido restringido conformacionalmente. Los precursores de péptidos adecuados pueden contener dos o más enlaces C-C no saturados. El método puede llevarse a cabo utilizando
- 65 técnicas de síntesis peptídica en fase sólida. En esta realización, el precursor que se ancla a un soporte sólido se pone en contacto con un catalizador RCM y el producto se escinde entonces del soporte sólido para dar lugar a un

péptido restringido conformacionalmente.

Otra estrategia, que desvela D. H. Rich en *Protease Inhibitors*, Barrett y Selveson, eds., Elsevier (1986), ha sido diseñar imitadores peptídicos mediante la aplicación del concepto de análogo en estado de transición en el diseño de un inhibidor enzimático. Por ejemplo, se sabe que el alcohol secundario de estalina imita el estado de transición tetraédrico del enlace amida escindible del sustrato de pepsina.

En resumen, las modificaciones terminales son útiles, como se conoce bien, para reducir la susceptibilidad a la digestión por proteasas y por lo tanto para prolongar la semivida de los péptidos en solución, particularmente en fluidos biológicos en los que pueden estar presentes las proteasas. La ciclación polipeptídica también es una modificación útil debido a las estructuras estables que se forman por ciclación y en vista de las actividades biológicas observadas por los péptidos cíclicos.

Por lo tanto, dicho polipéptido puede ser cíclico. Sin embargo, dicho polipéptido puede ser lineal de manera alternativa.

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una mayor potencia para la activación de células dendríticas que el anticuerpo anti-CD40 conocido "B44" (cuyas secuencias de aminoácidos se muestran en el Ejemplo 10 posteriormente).

El anticuerpo agonista B44 se origina a partir de la biblioteca n-CoDeR®, que es una biblioteca de presentación de fragmentos de anticuerpo humano, y propiedad de BioInvent International AB (Söderlind et al., 2000, *Nature Biotechnol.*, 18: 852-6; documento WO 98/32845). El anticuerpo B44 tiene una constante de afinidad (KD) moderada o baja de 1,7 nM, y una potencia moderada según se determina *in vitro* (Ellmark et al., 2002, *Immunology*, 106: 456-463; Ellmark et al., 2008, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 243, 367-372). La afinidad y potencia del anticuerpo agonista B44 lo hace inestable como un anticuerpo agonista anti-CD40 terapéuticamente relevante.

Más preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una potencia de activación de células dendríticas (medida como una CE50, como se describe en el Ejemplo 4) de al menos 0,5 µg/ml (es decir, la CE50 es menor o igual a 0,5 µg/ml). Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener una CE50 para la estimulación de CD80 (como se mide en el Ejemplo 4) o menos del 0,5 µg/ml, por ejemplo, menos de 0,4 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml, o menos de 0,05 µg/ml.

El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una especificidad de unión mejorada para CD40 con respecto a la del anticuerpo B44.

Con respecto a las especificidades de unión del anticuerpo, el parámetro cinético al que se hace más referencia comúnmente es su afinidad total, habitualmente expresado como la constante de disociación (KD). Este parámetro estático refleja la ocupación relativa de un receptor celular en equilibrio y es relevante para la administración sistémica. Sin embargo, durante la administración local el anticuerpo puede difundirse fuera del área local del tumor y por lo tanto el tiempo de reacción puede estar limitado. Por lo tanto, una velocidad de asociación alta (k_a alta) puede ser muy importante para el efecto clínico durante la administración local, ya que determina el tiempo que tarda el anticuerpo en alcanzar el equilibrio (Katakura et al., *Journal of Molecular Catalysis*, (28), 191-200, 2004). Además una baja velocidad de disociación (baja k_d) puede afectar la duración del tratamiento y puede servir para restringir el anticuerpo al área del tumor, minimizando de esta manera la exposición sistémica y la toxicidad.

Los métodos para medir la afinidad total (KD) y la velocidad de asociación (k_a) y velocidad de disociación (k_d) de una interacción (tal como la interacción entre un anticuerpo y un ligando) se conocen bien en la técnica. Los métodos *in vitro* a modo de ejemplo se describen en los Ejemplos adjuntos. También se concibe utilizar métodos basados en citometría de flujo (Sklar et al., *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, (31), 97-119, 2002).

El anticuerpo de la invención, o el fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una afinidad (KD) por el CD40 menor de $1,0 \times 10^{-10}$ M, por ejemplo una KD menor de $9,0 \times 10^{-11}$ M, $8,0 \times 10^{-11}$ M, $7,0 \times 10^{-11}$ M, $6,0 \times 10^{-11}$ M, $5,0 \times 10^{-11}$ M, $4,0 \times 10^{-11}$ M, $3,0 \times 10^{-11}$ M, $2,0 \times 10^{-11}$ M o menor de $1,0 \times 10^{-11}$ M.

En otra realización preferida, el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una velocidad de asociación para CD40 mayor que el anticuerpo B44, por ejemplo una velocidad de asociación (k_a) mayor de $2,7 \times 10^6$ Ms, y preferentemente una velocidad de asociación (k_a) mayor de $3,0 \times 10^6$ Ms; o $4,0 \times 10^6$ Ms; o $5,0 \times 10^6$ Ms; o $6,0 \times 10^6$ Ms; o $7,0 \times 10^6$ Ms; o $8,0 \times 10^6$ Ms; o $9,0 \times 10^6$ Ms; o $1,0 \times 10^7$ Ms.

En otra realización preferida, el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una velocidad de disociación para el CD40 menor que la del anticuerpo B44, por ejemplo una velocidad de disociación (k_d) menor de $4,5 \times 10^{-3}$ s, y preferentemente una velocidad de disociación menor de $3,0 \times 10^{-3}$ s; o $2,0 \times 10^{-3}$ s; o $1,0 \times 10^{-3}$ s; o $9,0 \times 10^{-4}$ s; o $8,0 \times 10^{-4}$ s; o $7,0 \times 10^{-4}$ s; o $6,0 \times 10^{-4}$ s; o $5,0 \times 10^{-4}$ s; o $3,0 \times 10^{-4}$ s; o $2,0 \times 10^{-4}$ s; o $1,0 \times 10^{-4}$ s; o $9,0 \times 10^{-5}$ s; o $8,0 \times 10^{-5}$ s; o $7,0 \times 10^{-5}$ s; o $6,0 \times 10^{-5}$ s; o $5,0 \times 10^{-5}$ s; o $4,0 \times 10^{-5}$ s; o $3,0 \times 10^{-5}$ s; o $2,0 \times 10^{-5}$ s; o $1,0 \times 10^{-6}$ s.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo tiene una afinidad (DK) por el CD40 en el intervalo de $1,0 \times 10^{-10}$ M a 1×10^{-11} M y una velocidad de asociación para el CD40 en el intervalo de $2,7 \times 10^6$ a 1×10^7 Ms.

- 5 Normalmente, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, con una afinidad por el CD40 localizado en la superficie de una célula.

10 Por "localizado en la superficie de una célula" los inventores incluyen el significado de que el CD50 está asociado con la célula de manera que una o más regiones del CD40 están presentes en la cara externa de la superficie celular. Por ejemplo, el CD40 puede estar insertado en la membrana plasmática celular (es decir, se oriente como una proteína transmembrana) con una o más regiones presentadas en la superficie extracelular. De manera alternativa, el CD40 puede estar fuera de la célula con interacciones covalentes y/o iónicas que lo localizan en una región o regiones específicas de la superficie celular.

- 15 Por lo tanto, por "superficie de una célula cancerosa" los inventores incluyen el significado de que el CD40 se localiza de tal manera en relación con una o más células derivadas de, o características de una célula cancerosa o tumor.

20 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende o consiste en un anticuerpo intacto.

25 De manera alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende o consiste en un fragmento de unión al antígeno seleccionado de entre el grupo que consiste en: un fragmento Fv (tal como un fragmento Fv de cadena sencilla, o un fragmento Fv unido por disulfuro), y un fragmento tipo Fab (tal como un fragmento Fab; un fragmento Fab' o un fragmento F(ab')₂).

Por ejemplo el fragmento de unión al antígeno puede comprender un scFv.

- 30 Por "moléculas scFv" los inventores incluyen moléculas en las que los dominios equivalentes V_H y V_L están unidos mediante un oligopéptido flexible.

35 Las ventajas potenciales del uso de fragmentos de anticuerpos, más que de anticuerpos completos, son varias. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede dar lugar a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mejor penetración en el sitio diana. Las funciones efectoras de los anticuerpos completos, tales como la unión al complemento, se han eliminado. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, scFv y dAb se pueden expresar y secretar en *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

40 Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención es una molécula recombinante.

Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, se prefiere que sea un anticuerpo monoclonal, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, derivado de un anticuerpo monoclonal.

- 45 Los anticuerpos monoclonales adecuados se pueden preparar por técnicas conocidas, por ejemplo, las que se desvelan en "Monoclonal Antibodies; A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", SGR Hurrell (CRC Press, 1982). Los anticuerpos policlonales pueden producirse como poli-específicos o mono-específicos. Se prefieren los mono-específicos.

50 Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, es humano o humanizado.

55 Los anticuerpos pueden ser humanos en el sentido de que tienen la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos humanos con especificidad para la proteína CD40 que se define en el presente documento, sin embargo se apreciará que se pueden preparar utilizando métodos conocidos en la técnica y que no se necesita la inmunización de seres humanos. Por ejemplo, los polipéptidos de anticuerpo se pueden producir *in vitro* en una línea celular humana o no humana. De manera alternativa, están disponibles ratones transgénicos que contienen, en esencia, genes de inmunoglobulina humana (véase Vaughan et al (1998) Nature Biotechnol. 16, 535-539).

60 Los anticuerpos no humanos preparados adecuadamente se pueden "humanizar" de formas conocidas, por ejemplo insertando las regiones de anticuerpos de ratón en la matriz de anticuerpos humanos.

Los anticuerpos quiméricos se exponen en Neuberger et al (1998, 8º International Biotechnology Symposium Parte 2, 792-799).

- 65 Los expertos en la técnica apreciarán que la especificidad de unión de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo la confiere la presencia de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera constitutivas. Como se expone posteriormente, en una realización

particularmente preferida de los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se definen en el presente documento, la especificidad de unión para CD40 la confiere la presencia de una o más de las secuencias de aminoácidos de las CDR que se definen en el presente documento.

El término “aminoácido” como se utiliza en el presente documento incluyen los veinte aminoácidos convencionales codificados genéticamente y sus correspondientes estereoisómeros de forma ‘D’ (en comparación con la forma natural ‘L’), omega-aminoácidos distintos de aminoácidos de origen natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo, los aminoácidos α , α -disustituidos, N-alkil aminoácidos, etc.) y los aminoácidos derivados químicamente (véase posteriormente).

Cuando se cita específicamente un aminoácido, tal como “alanina” o “Ala” o “A”, el término se refiere a la L-alanina y la D-alanina a menos de que se establezca explícitamente otra cosa. También pueden ser adecuados otros aminoácidos no convencionales para los polipéptidos de la presente invención, a condición de que mantengan la propiedad funcional deseada para el polipéptido. Para los péptidos que se muestran, cada resto de aminoácido codificado, si fuera apropiado, se presenta por una designación de una sola letra, que corresponde al nombre trivial del aminoácido convencional.

En una realización, los polipéptidos que se definen en el presente documento comprenden o consiste en L-aminoácidos.

El anticuerpo o fragmento comprende una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

CTGSX₁SNIGX₂VY [SEQ ID NO: 1]

en la que:

X₁ es S o T; y
X₂ es K o H o D o G o N.

El anticuerpo o fragmento comprende adicionalmente una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

X₃NINRPS [SEQ ID NO: 2]

en la que:

X₃ es G o R.

El anticuerpo o fragmento comprende adicionalmente una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

CAAWDX₄X₅X₆X₇GLX₈ [SEQ ID NO: 3]

en la que:

X₄ es D o S o E o G o K; y
X₅ es S o T o G; y
X₆ es L o S o T o L o I; y
X₇ es S o T o L; y
X₈ es V o L.

Más preferentemente, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena ligera variable (V_L) en el que la CDR1 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

CTGSTSNIGAGYKVY	[SEQ ID NO: 4]; y
CTGSSSNIGAGYHVV	[SEQ ID NO: 5]; y
CTGSSSNIGAGYKVY	[SEQ ID NO: 6]; y
CTGSSSNIGAGYDVY	[SEQ ID NO: 7]; y
CTGSSSNIGAGYGVY	[SEQ ID NO: 8]; y
CTGSSSNIGAGYNVY	[SEQ ID NO: 9].

Más preferentemente, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR2 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

GNINRPS	[SEQ ID NO: 10]; y
RNINRPS	[SEQ ID NO: 11].

Más preferentemente, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena ligera variable (V_L) en la que la CD3 comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

CAAWDDSLGLV	[SEQ ID NO: 12]; y
CAAWDSSSLGLV	[SEQ ID NO: 13]; y
CAAWDESITGLV	[SEQ ID NO: 14]; y
CAAWDGSLLGLV	[SEQ ID NO: 15]; y
CAAWDGTLTGLL	[SEQ ID NO: 16]; y
CAAWDKSISGLV	[SEQ ID NO: 17]; y
CAAWDGLLGLV	[SEQ ID NO: 18].

5 En realizaciones particularmente preferidas de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una cadena ligera variable (V_L) que comprende las siguientes CDR:

- 10 (i) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; o
 (ii) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; o
 (iii) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13; o
 (iv) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; o
 (v) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14; o
 (vi) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15; o
 (vii) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 16; o
 15 (viii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 17; o
 (ix) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12; o
 (x) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 18.

20 En una realización preferida adicional, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena ligera variable (V_L) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en:

SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 21; SEQ ID NO: 22; SEQ ID NO: 23; SEQ ID NO: 24; SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 26; y SEQ ID NO: 27.

25 En una realización, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena ligera constante (CL) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63.

El anticuerpo o fragmento comprende adicionalmente una cadena pesada variable (V_H) en la que la CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

30 GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]

El anticuerpo o fragmento comprende adicionalmente una cadena pesada variable (V_H) en la que la CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

35 KGKLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]

El anticuerpo o fragmento comprende adicionalmente una cadena pesada variable (V_H) en la que la CDR3 comprende o consiste la secuencia de aminoácidos de:

40 CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30].

En una realización particularmente preferida de la invención, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena variable (V_H) que comprende las CDR de SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.

45 En una realización preferida adicional, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena pesada variable (V_H) que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de entre el grupo que consiste en:

50 SEQ ID NO: 31; SEQ ID NO: 32; SEQ ID NO: 33; SEQ ID NO: 34; SEQ ID NO: 35; SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; y SEQ ID NO: 39.

En una realización, el anticuerpo o fragmento comprende una cadena pesada constante (CH) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

55 Se prefiere particularmente que el anticuerpo o fragmento comprenda las siguientes CDR:

- (i) SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (ii) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (iii) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o

- (iv) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (v) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (vi) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (vii) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (viii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (ix) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
 (x) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención se une a un epítipo en el primer dominio (D1) del CD40 (preferentemente, el CD40 humano).

Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede competir por la unión con el CD40 con uno o más de los anticuerpo a modo de ejemplo de la invención (véase la Tabla A; como se describe en los Ejemplos posteriormente).

Tabla A

Anticuerpos a modo de ejemplo de la invención (regiones variables)		
Anticuerpo a modo de ejemplo	Secuencia de aminoácidos	
	V _L	V _H
A4	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 31
A5	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 32
C4	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 33
G4	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 34
F6	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 35
F9	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 36
G12	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 37
H12	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 38
B9 y H11	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 39

Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, puede unirse al mismo epítipo de CD40 como uno o más de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención.

En una realización preferida, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención comprende las parejas V_L y V_H de uno de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención (como se muestra en la Tabla A). Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno derivado del mismo, comprende una cadena ligera variable (V_L) y una cadena pesada variable (V_H) que comprende las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (i) SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 31; o
 (ii) SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 32; o
 (iii) SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 33; o
 (iv) SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 34; o
 (v) SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 35; o
 (vi) SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 36; o
 (vii) SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 37; o
 (viii) SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 38; o
 (ix) SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 39.

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende una región Fc de anticuerpo. Los expertos en la técnica apreciarán que la parte Fc puede ser de un anticuerpo IgG, o de una clase diferente de anticuerpo (tal como IgM, IgA, IgD o IgE). Por ejemplo, la región Fc puede ser de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Ventajosamente, sin embargo, la región Fc es de un anticuerpo IgG1.

La región Fc puede ser de origen natural (por ejemplo, parte de un anticuerpo producido endógenamente) o puede ser artificial (por ejemplo, que comprende una o más mutaciones puntuales con respecto a una región Fc de origen natural). Las regiones FC con mutaciones puntuales que mejoran su capacidad para unirse al FcR pueden ser ventajosas, por ejemplo, alternado la semivida sérica o mejora la unión a los receptores del Fcγ (FcγR) implicados en ADCC y CDC. En particular, las mutaciones que aumentan la unión al FcγRIIB, por ejemplo S267E (Strohl et al., 2009, Curr Opin Biotechnol, 20: 685-691) puede ser ventajoso para la invención dando el enlace entre la unión a

FcγRIIB y la actividad funcional de los anticuerpos CD40 (Li et al., 2011, Science, 333: 1030-1034).

En una realización, la región Fc comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.

- 5 Se prefiere que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención sea una molécula de IgG, o es un fragmento de unión al antígeno de una molécula de IgG. La secuencia de aminoácidos de una secuencia de IgG particularmente preferida se describe en los Ejemplos adjuntos.

- 10 En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención comprende adicionalmente un resto citotóxico, que puede ser citotóxico directa o indirectamente.

- 15 Por "directamente citotóxico" los inventores incluyen el significado de que el resto es el que es citotóxico por sí mismo. Por "indirectamente citotóxico" los inventores incluyen el significado de que el resto es el que aunque no es citotóxico por sí mismo, puede inducir citotoxicidad, por ejemplo por su acción sobre una molécula adicional o por una acción adicional sobre él.

Convenientemente, el resto citotóxico es citotóxico cuando es intracelular y preferentemente, no es tóxico cuando es extracelular.

- 20 Preferentemente, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el resto citotóxico es un agente quimioterápico directamente citotóxico. Opcionalmente, el resto citotóxico es un polipéptido directamente citotóxico. Los agentes quimioterápicos citotóxicos son bien conocidos en la técnica.

- 25 Los agentes quimioterápicos citotóxicos, tales como los agentes anticáncer, incluyen: agentes alquilantes incluyendo las mostazas nitrogenadas tales como mecloretamina (HN₂), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan (L-sarcosina) y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina, tiotepa; alquil sulfonatos tales como busulfan; nitrosoureas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) y estreptozocina (estreptozotocina); y triacenos tales como decarbazida (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida); antimetabolitos que incluyen el ácido fólico y análogos tales como el metotrexato (ametopterina); análogos de pirimidinas tales como el fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de purina e inhibidores relacionados tales como al mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina). Productos naturales que incluyen alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorrubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina C); enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como alfenomas de interferón. Agentes misceláneos que incluyen la coordinación de complejos de platino tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracenodiona tales como mitoxantrona y antraciclina; urea sustituida tal como la hidroxurea; derivado de metilhidracina tal como procarbazona (N-metilhidracina, MIH); y supresores adrenocorticales tales como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos derivados; y agonistas/antagonistas hormonales como la flutamida y tamoxifeno.
- 30
- 35
- 40

- Se había unido varios de estos agentes a anticuerpos y otros agentes de suministro dirigido al sitio, y por tanto, los anticuerpos de la invención que comprenden estos agentes pueden fabricarse fácilmente por el experto en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la conjugación de carbodiimida (Bauminger y Wilchek (1980) Methods Enzymol. 70, 151-159) para conjugar varios agentes, incluyendo doxorubicina, a anticuerpos o péptidos.
- 45

- Las carbodiimidas comprende un grupo de compuestos que tienen la fórmula general R1-N=C=N-R2, donde R1 y R2 pueden ser alifáticos o aromáticos, y se utilizan para la síntesis de enlaces peptídicos. El procedimiento de preparación es simple, relativamente rápido, y se lleva a cabo en condiciones medias. Los compuestos de carbodiimida atacan los grupos carboxilo para cambiarlos a sitios reactivos para grupos amino libres.
- 50

- La carbodiimida hidrosoluble, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es particularmente útil para conjugar un resto funcional a un resto de unión y puede utilizarse para conjugar la doxorubicina a péptidos que se dirigen al tumor. La conjugación de doxorubicina y un resto de unión necesita la presencia de un grupo amino, que es proporcionado por la doxorubicina, y un grupo carboxilo, que es proporcionado por la doxorubicina, y un grupo carboxilo, que es proporcionado por el anticuerpo.
- 55

- Además de utilizar carbodiimidas para la formación directa de enlaces peptídicos, también se pueden utilizar EDC para preparar esteres activos tales como el éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). El éster de NHS, que solo se une a grupos amino, se puede utilizar entonces para inducir la formación de un enlace amida con el único grupo amino de la doxorubicina. Para utilizar la EDC y NHS en combinación se utilizan comúnmente por conjugación con el fin de aumentar el rendimiento de la formación de conjugado (Bauminger y Wilchek, supra, 1980).
- 60

- También se pueden utilizar otros métodos para conjugar un resto citotóxico a los anticuerpos. Por ejemplo, se puede utilizar la oxidación por peryodato de sodio seguido por alquilación reductora de reactivos apropiados, como los que pueden entrecruzarse con glutaraldehído. Sin embargo, se reconoce que, independientemente del método de
- 65

producción de un conjugado de la invención se seleccione, se debe hacer una determinación de que el anticuerpo mantenga su capacidad de direccionamiento y que el resto funcional mantiene su función relevante.

En una realización de la invención, el resto citotóxico es un resto peptídico o polipeptídico citotóxico en el que se incluye cualquier resto que dé lugar a muerte celular. Los restos peptídicos o polipeptídicos citotóxicos se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, ricino, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, factor tisular, y similares. Los métodos para unirlos a los restos de direccionamiento tales como los anticuerpos también se conocen en la técnica. El uso de ricino como agente citotóxico se describe en Burrows y Thorpe (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8996-9000, y el uso de factor tisular, que da lugar a la coagulación localizada de la sangre y el infarto de un tumor, se ha descrito por Ran et al (1998) Cancer Res. 58, 4646-4653 y Huang et al (1997) Science 275, 547-550. Tsai et al (1995) Dis. Colon Rectum 38, 1067-1074 describe la cadena A de abrina conjugada con un anticuerpo monoclonal. Otras proteínas que inactivan el ribosoma se describen como agentes citotóxicos en el documento WO 96/06641. La exotoxina de *Pseudomonas* también se puede utilizar como el resto polipeptídico citotóxico (véase por ejemplo, Aiello et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10457-10461).

Ciertas citocinas tales como el TNF- α e IL-2, también pueden ser agentes citotóxicos útiles.

Ciertos átomos radioactivos también pueden ser citotóxicos si se suministran en dosis suficientes. Por lo tanto, el resto citotóxico puede comprender un átomo radioactivo que, al usarlo, suministra una cantidad suficiente de radioactividad en el sitio diana como ara ser citotóxico. Los átomos radioactivos adecuados incluyen fósforo-32, yodo-125, yodo-131, indio-111, renio-186, renio-188 o itrio-90, o cualquier otro isótopo que emita suficiente energía para destruir células, orgánulos o ácido nucleico vecinos. Preferentemente, los isótopos y la densidad de los átomos radioactivos en los agentes de la invención son de tal manera que una dosis de más de 4000 cGy (preferentemente al menos 6000, 8000 o 10000 cGy) se suministra en el sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y sus orgánulos, particularmente el núcleo.

El átomo radioactivo se puede unir al anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo de maneras conocidas. Por ejemplo, se puede unir EDTA u otro agente quelante al resto de unión y se utiliza para unir el ^{111}In o ^{90}Y . Los restos de tirosina se pueden marcar directamente con ^{125}I o ^{131}I .

El resto citotóxico puede ser un polipéptido indirectamente citotóxico adecuado. En una realización particularmente preferida, el polipéptido indirectamente citotóxico es un polipéptido que tiene actividad enzimática y puede convertir un profármaco no tóxico y/o relativamente no tóxico en un fármaco citotóxico. Con los anticuerpos, se hace referencia a menudo a este tipo de sistema como ADEPT (Terapia de profármaco enzimático dirigido por anticuerpos). El sistema necesita que el anticuerpo localice la parte enzimática del sitio deseado en el cuerpo del paciente y tras dejar el tiempo para que la enzima localice el sitio, administrar un profármaco que es un sustrato para la enzima, siendo el producto final de la catálisis un compuesto citotóxico. El objetivo de esta estrategia es maximizar la concentración el fármaco en el sitio deseado y minimizar la concentración del fármaco en tejidos normales (véase Senter, P.D. et al (1988) "Anti-tumour effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4842-4846; Bagshawe (1987) Br. J. Cancer 56, 531-2; y Bagshawe, K.D. et al (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" Br. J. Cancer. 58, 700-703.)

En una realización preferida, el resto citotóxico es capaz de convertir un profármaco no citotóxico en un fármaco citotóxico.

La enzima y el profármaco del sistema que utiliza una enzima dirigida como se describe en el presente documento puede ser cualquiera de los propuestos anteriormente. La sustancia citotóxica puede ser cualquier fármaco anticáncer existente tal como un agente alquilante; un agente que se intercale en el ADN; un agente que inhibe cualquiera de las enzimas claves tales como la dihidrofolato reductasa, timidina sintetasa, ribonucleótido reductasa, nucleótido cinasas o topoisomerasa; o un agente que efectúa la muerte celular interactuando con cualquier otro constituyente celular. El etopósido es un ejemplo de inhibidor de topoisomerasa.

Los sistemas de profármaco expuestos incluyen: un profármaco de mostaza fenólica activada por una β -glucuronidasa de *E. coli* (Wang et al, 1992 y Roffler et al, 1991); un profármaco de doxorrubicina activada por un α -glucuronidasa humana (Bosslet et al, 1994); profármacos adicionales de doxorrubicina activada por α -D-galactosidasa de grano de café (Azoulay et al, 1995); profármaco de daunorrubicina, activados por α -D-galactosidasa de grano de café (Gesson et al, 1994); un profármaco 5-fluorouridina activado por una β -D-galactosidasa de *E. coli* (Abraham et al, 1994); y profármacos de metotrexato (por ejemplo, metotrexato-alanina) activados por carboxipeptidasa A (Kuefner et al, 1990, Vitols et al, 1992 y Vitols et al, 1995). Estos y otros se incluyen en la Tabla B, posteriormente.

Tabla B

Enzima	Profármaco
Carboxipeptidasa G2	Derivados de ácido L-glutámico y mostazas de ácido benzoico, mostazas de anilina, mostazas de fenol y mostazas de fenilendiamina; derivados fluorados de estos
Fosfatasa alcalina	Fosfato de Etopósido Fosfato de Mitomicina
Beta-glucuronidasa	Mostaza de p-Hidroxianilina -glucurónido Epirubicina-glucurónido
Penicilina-V-amidasa	Adriamicina-N fenoxiacetilo
Penicilina-G-amidasa	N-(4'-hidroxifenil acetil) palitoxina Doxorubicina y melfalan
Beta-lactamasa	Mostaza nitrogenada -cefalosporina p-fenilendiamina; derivados de doxorubicina; derivado de vinblastina -cefalosporina, mostaza de cefalosporina; un derivado de taxol
Beta-glucosidasa	ácido Cianofenilmetil-beta-D-gluco-piranosidurónico
Nitrorreductasa	5-(Azaridin-1-il)-2,4-dinitrobenzamida
Citosina desaminasa	5-Fluorocitosina
Carboxipeptidasa A	Metotrexato-alanina

La Tabla A está adaptada de Bagshawe (1995) Drug Dev. Res. 34, 220-230, de la que se pueden obtener referencias completas de estos distintos sistemas; el derivado de taxol se describe en Rodrigues, M.L. et al (1995) Chemistry and Biology 2, 223).

Las enzimas adecuadas para formar parte de una porción enzimática incluyen: exopeptidasas, tales como las carboxipeptidasas G, G1 y G2 (para los profármacos de mostazas glutaminadas), carboxipeptidasas A y B (para profármacos basados en MTX) y aminopeptidasas (para profármacos 2- α -aminocil MTC); endopeptidasas, tales como, por ejemplo, trombolisina (para profármacos de trombina); hidrolasas, tales como fosfatasas (por ejemplo fosfatasa alcalina) o sulfatasas (por ejemplo, aril sulfatasas) (para profármacos fosforilados o sulfatados); amidasas, tales como las penicilina amidasas y arilcil amidasas; lactamasas, tales como las β -lactamasas; glicosidasas, tal como la β -glucuronidasa (para β -glucuronomida antraciclinas), α -galactosidasa (para amigdalina) y β -galactosidasas (para β -galactosa antraciclina); desaminasas, tal como citosina desaminasa (para 5 FC); cinasas, tales como urocinasa y timidina cinasa (para ganciclovir); reductasa, tales como nitrorreductasa (para CB1954 y análogos), azorreductasa (para mostazas de azobenceno) y DT-diaforasa (para CB1954); oxidasas, tal como glucosa oxidasa (para la glucosa), xantina oxidasa (para la xantina) y lactoperoxidasa; DL-racemasas, anticuerpos catalíticos y ciclodextrinas.

Preferentemente, el profármaco es relativamente no tóxico en comparación con el fármaco citotóxico. normalmente, tiene menos del 10 % de la toxicidad, preferentemente menos del 1 % de la toxicidad según se mide en un ensayo de citotoxicidad *in vitro* adecuado.

Es probable que el resto que es capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico será activo en aislamiento del resto del agente de la invención pero es necesario solo que sea activo cuando (a) esté en combinación con el resto del agente de la invención y (b) el agente de la invención se una, está adyacente o se internaliza en las células diana.

Cuando cada resto es un polipéptido, las dos partes se pueden unir entre ellos por cualquiera de las maneras convencionales de entrecruzamiento de polipéptidos, tal como los que se describen en general en O'Sullivan et al (1979) Anal. Biochem. 100, 100-108. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, se puede enriquecer con grupos tiol y el resto adicional reacciona con un agente bifuncional capaz de reaccionar con los grupos tiol, por ejemplo, el éster de N-hidroxisuccinimida o ácido yodoacético (NHIA) o propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP). Los enlaces amida y tioéter, por ejemplo, se consiguen con éster de m-maleimidobenzol-N-hidroxisuccinimida, son en general más estables *in vivo* que los enlaces disulfuro.

De manera alternativa, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo se puede producir como un compuesto de fusión por técnicas de ADN recombinante de manera que una longitud de ADN comprende las regiones respectivas que codifican los dos restos del agente de la invención, sea adyacentes entre ellos o separados por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del agente. Posiblemente, las dos partes del agente pueden solaparse completa o parcialmente.

El resto citotóxico puede ser un radiosensibilizante. Los radiosensibilizantes incluyen las fluoropirimidinas, análogos de tiamina, hidroxiurea, gemcitabina, fludarabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamida, etanixadol, pirimidiazol, y misonidazol (véase, por ejemplo, McGinn et al (1996) J. Natl. Cancer Inst. 88, 1193-11203; Shewach y Lawrence (1996) Invest. New Drugs 14, 257-263; Horsman (1995) Acta Oncol. 34, 571-587; Shenoy y Singh (1992) Clin. Invest. 10, 533-551; Mitchell et al (1989) Int. J. Radiat. Biol. 56, 827-836; Iliakis y Kurtzman (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 1235-1241; Brown (1989) Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 987-993; Brown (1985) Cancer 55, 2222-2228).

También el suministro de los genes en las células puede radiosensibilizarlas, por ejemplo, el suministro del gen p53 o ciclina D (Lang et al (1998) J. Neurosurg. 89, 125-132; Coco Martin et al (1999) Cancer Res. 59, 1134-1140).

El resto adicional puede ser el que se vuelva citotóxico, o libere un seto citotóxico, al irradiarse. Por ejemplo, cuando se radia apropiadamente el isótopo boro-10, libera partículas α que son citotóxicas (por ejemplo, véase el documento US 4, 348, 376 de Goldenberg; Primus et al (1996) Bioconjug. Chem. 7, 532-535).

De manera similar, el resto citotóxico puede ser el que sea útil en terapia fotodinámica tal como fotofrina (véase, por ejemplo, Dougherty et al (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905).

El resto adicional puede comprender una molécula de ácido nucleico que es directa o indirectamente citotóxico. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido anti sentido que, al localizarse en el sitio diana es capaz de entrar en las células y dar lugar a su muerte. El oligonucleótido, por lo tanto, puede ser el que evita la expresión de un gen esencial, o que da lugar a un cambio en la expresión genética que produce apoptosis. De manera alternativa, el resto citotóxico es una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido directa y/o indirectamente citotóxico.

Ejemplos de oligonucleótidos adecuados incluyen los dirigidos a bcl-2 (Ziegler et al (1997) J. Natl. Cancer Inst. 89, 1027-1036), y la ADN polimerasa α y topoisomerasa II α (Lee et al (1996) Anticancer Res. 16, 1805-1811).

Los ácidos nucleicos peptídicos pueden ser útiles en lugar de los ácidos nucleicos convencionales (véase Knudsen y Nielsen (1997) Anticancer Drugs 8, 113-118).

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede estar comprendido en un vehículo de suministro para el suministro de ácido nucleico a la diana. El vehículo de suministro puede ser cualquier vehículo de suministro adecuado. Puede ser, por ejemplo, un liposoma que contenga el ácido nucleico, o puede ser un virus o partícula tipo virus que es capaz de suministrar el ácido nucleico. En estos casos, la molécula que se va a suministrar está presente normalmente en la superficie del vehículo de suministro. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo adecuado puede estar presente en la superficie externa de un liposoma y el ácido nucleico que se va a suministrar puede estar presente en el interior del liposoma. Como otro ejemplo, se modifica un vector vírico, tal como un vector retrovírico o adenovírico de manera que el resto de unión se une o localiza en la superficie de la partícula vírica haciendo posible de esta manera que la partícula vírica se dirija al sitio deseado. También se conocen sistemas de suministro dirigido tales como el sistema de adenovirus modificado descrito en el documento WO 94/10323 en el que, normalmente, el ADN se alberga en el adenovirus o partícula tipo adenovirus. Michael et al (1995) Gene Therapy 2, 660-668, describe la modificación de adenovirus para añadir un resto selectivo celular en una proteína de la fibra. Los retrovirus dirigidos también están disponibles para su uso en la invención; por ejemplo, se pueden modificar las secuencias que confieren afinidades de unión específica en genes *env* víricos existentes (véase Miller y Vile (1995) Faseb J. 9, 190-199 para una revisión de estos y otros vectores dirigidos para terapia genética).

Se pueden utilizar inmunoliposomas (liposomas dirigidos por anticuerpos). Para la preparación de inmunoliposomas, se sintetiza MPB-PE (N-[4-(p-maleimidofenil)-butiril]-fosfatidiletanolamina) de acuerdo con el método de Martin y Papahadjopoulos (1982) J. Biol. Chem. 257, 286-288. El MPB-PE se incorpora en las bicapas liposómicas para permitir un acoplamiento del anticuerpo, o el fragmento del mismo, en la superficie liposómica. El liposoma se carga convenientemente con el ADN u otra construcción genética para el suministro a las células diana, por ejemplo, formando dichos liposomas en una solución del ADN u otra construcción genética, seguido por la extrusión secuencial a través de filtros de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0,6 μ m y 0,2 μ m bajo presiones de nitrógeno de hasta 0,8 MPa. Después de la extrusión, la construcción de ADN atrapada se separa de la construcción libre de ADN por ultracentrifugación a 80 000 x g durante 45 min. Los liposomas de MPB-PE recién preparados en tampón desoxigenado se mezclan con anticuerpo recién preparado (o un fragmento del mismo) y se llevan a cabo las reacciones de acoplamiento en una atmósfera de nitrógeno a 4 °C con rotación end-over-end constante durante una noche. Los inmunoliposomas se separan de los anticuerpos no conjugados por ultracentrifugación a 80000 x g durante 45 min. Los inmunoliposomas pueden inyectarse por vía intraperitoneal o directamente en el tumor.

El ácido nucleico suministrado en el sitio de la diana puede ser cualquier ADN adecuado que dé lugar, directa o indirectamente, a citotoxicidad. Por ejemplo, el ácido nucleico puede codificar una ribozima que es citotóxica para la célula, o que puede codificar una enzima que sea capaz de convertir un profármaco sustancialmente no tóxico en un

fármaco citotóxico (este último sistema se llama a veces GDEPT: Terapia con profármaco enzimático dirigido genéticamente).

Las ribozimas que se pueden codificar en el ácido nucleico para suministrarse a la diana se describen en Cech y Herschlag "Site-specific cleavage of single stranded DNA" documento US 5.180.818; Altman et al "Cleavage of targeted RNA by RNase P" documento US 5.168.053, Cantin et al "Ribozyme cleavage of HIV-1 RNA" documento US 5.149.796; Cech et al "RNA ribozyme restriction endoribonucleases and methods", documento US 5.116.742; Been et al "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endonucleases and methods", documento US 5.093.246; y Been et al "RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribonucleases and methods; cleaves single-stranded RNA at specific site by transesterification", documento US 4.987.071. Las dianas para ribozimas incluyen factores de transcripción tales como c-fos y c-myc, y bcl-2. Durai et al (1997) Anticancer Res. 17, 3307-3312 describe una ribozima hammerhead contra bcl-2.

El documento EP 0 415 731 describe el sistema GDEPT. Se aplican consideraciones similares relativas a la elección de la enzima y el profármaco en el sistema GDEPT que en el sistema ADEPT descrito anteriormente.

El ácido nucleico suministrado en el sitio diana puede codificar un polipéptido directamente citotóxico.

De manera alternativa, el resto adicional puede comprender un polipéptido o un polinucleótido que codifica un polipéptido que no es directa o indirectamente citotóxico, sino que tiene un beneficio terapéutico. Ejemplos de dichos polipéptidos incluye citocinas anti-proliferativas o anti-inflamatorias, y anti-proliferativos, inmunomoduladores o factores que tienen influencia sobre la coagulación sanguínea que pueden ser beneficiosos en medicina, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

El resto adicional puede ser de manera útil un inhibidor de la angiogénesis tal como los péptidos angiostatina o endostatina. El resto adicional puede ser también de manera útil una enzima que convierte un precursor de polipéptidos en angiostatina o endostatina. Las metaloproteasas de la matriz humanas tales como la elastasa, gelatinasa y estromolisina de macrófagos convierten el plasminógeno en angiostatina (Cornelius et al (1998) J. Immunol. 161, 6845-6852). El plasminógeno es un precursor de la angiostatina.

En una realización, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un resto citotóxico que comprende un átomo radioactivo, por ejemplo un átomo radioactivo seleccionado de entre el grupo que consiste en fósforo-32; yodo-125; yodo-131, indio-111; renio-186; renio-188; itrio-90.

En una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende adicionalmente un resto fácilmente detectable.

Por un "resto fácilmente detectable" los inventores incluyen el significado de que el resto es uno que, cuando se localiza en el sitio diana después de la administración del agente de la invención en un paciente, se puede detectar, normalmente de manera no invasiva desde fuera del cuerpo y el sitio de a diana localizado. Por lo tanto, los agentes de esta realización de la invención son útiles en la creación de imágenes y diagnóstico.

Normalmente, el resto fácilmente detectable es o comprende un átomo radioactivo que es útil en la creación de imágenes. Los átomos radioactivos adecuados incluyen ^{99m}Tc y ^{123}I para los estudios de centelleo. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de centrifugación para creación de imágenes por resonancia magnética (MRI) tales como ^{123}I de nuevo, ^{131}I , ^{111}In , ^{19}F , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, el agente de la invención tiene que tener suficientes isótopos atómicos apropiados con el fin de que la molécula se a fácilmente detectable.

El radiomarcador u otros se pueden incorporar de maneras conocidas. Por ejemplo, el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo, se puede biosintetizar o se puede sintetizar por síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{186}Rh , ^{188}Rh y ^{111}In pueden, por ejemplo, unirse mediante los restos de cisteína en los polipéptidos. El itrio-90 se puede unir mediante un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) puede utilizarse para incorporar ^{123}I . La referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros métodos en detalle.

Preferentemente, el resto fácilmente detectable comprende un átomo radioactivo, tal como por ejemplo el tecnecio-99m o yodo-123.

De manera alternativa, el resto fácilmente detectable se puede seleccionar de entre el grupo que comprende: yodo-123; yodo-131; indio-111; flúor-19; carbono-13; nitrógeno-15; oxígeno-17; gadolinio; manganeso; hierro.

En una realización preferida adicional de la invención el resto adicional es capaz de unirse selectivamente a un resto directa o indirectamente citotóxico o a un resto fácilmente detectable. Por lo tanto, en la presente realización, el resto adicional puede ser cualquier resto que se una a un compuesto o componente adicional que sea citotóxico o

fácilmente detectable.

El resto adicional puede ser, por lo tanto, un anticuerpo que se une selectivamente al compuesto o componente adicional, o puede ser algún otro resto de unión tal como la Estreptavidina o biotina o similares. Los siguientes ejemplos ilustran los tipos de moléculas que están incluidas en la invención; otras de dichas moléculas son fácilmente aparentes de las enseñanzas del presente documento.

Un anticuerpo bi-específico en el que un sitio de unión comprende el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo, de la invención, y el segundo sitio de unión comprende un resto que se une a, por ejemplo, una enzima que es capaz de convertir un profármaco sustancialmente no tóxico en un fármaco citotóxico.

Se apreciará que los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno del mismo, de la invención son reactivos útiles de investigación y agentes terapéuticos. De manera adecuada, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno del mismo, de la invención se marcan detectablemente, por ejemplo se pueden marcar de manera que se detecten directa o indirectamente.

Convenientemente, los anticuerpos se marcan con un resto radioactivo o un resto coloreado o un resto fluorescente, o se pueden unir a una enzima. Normalmente, la enzima es la que puede convertir un sustrato no coloreado (o no fluorescente) en un producto coloreado (o fluorescente). El anticuerpo se puede marcar con biotina (o estreptavidina) y entonces detectarlo indirectamente utilizando estreptavidina (o biotina) que se ha marcado con un resto radioactivo o un resto coloreado o un resto fluorescente, o similares o se han unido a una enzima del tipo descrito anteriormente.

Preferentemente, el resto fácilmente detectable comprende un átomo radioactivo, por ejemplo, tecnecio-99m o yodo-123, o átomos radioactivos seleccionados de entre el grupo que consiste en: yodo-123; yodo-131; indio-111; flúor-19; carbono-13; nitrógeno-15; oxígeno-17; gadolinio; manganeso; hierro.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la invención. Por "molécula de ácido nucleico" los inventores incluyen moléculas de ADN, ADNc y ARNm, que pueden ser de cadena simple o doble.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico comprende una o más secuencias de nucleótidos que se seleccionan de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; o SEQ ID NO: 43; o SEQ ID NO: 44; o SEQ ID NO: 45; o SEQ ID NO: 46; o SEQ ID NO: 47; o SEQ ID NO: 48; o SEQ ID NO: 49; o SEQ ID NO: 50; o SEQ ID NO: 51; o SEQ ID NO: 52; o SEQ ID NO: 53; o SEQ ID NO: 54; o SEQ ID NO: 55; o SEQ ID NO: 56; o SEQ ID NO: 57.

Más preferentemente, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos:

- (i) SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 49; o
- (ii) SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 50; o
- (iii) SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 52; o
- (iv) SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 53; o
- (v) SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 54; o
- (vi) SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 55; o
- (vii) SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 56; o
- (viii) SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 57; o
- (ix) SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 51.

En un tercer aspecto, la invención proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

Preferentemente, el vector es un vector de expresión. Por "vector de expresión" los inventores quieren decir el que es capaz, en un huésped apropiado, de expresar un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico.

Dichos vectores pueden ser útiles en la expresión del anticuerpo codificado, fragmento de unión al antígeno, variante, fusión o derivado del mismo, de la invención en una célula huésped para la producción de cantidades útiles.

Se han desarrollado varios métodos para unir operativamente moléculas de ácidos nucleicos, especialmente ADN, al vector, por ejemplo, mediante extremos cohesivos complementarios. Por ejemplo, se pueden añadir tratos de homopolímero complementarios al segmento de ADN que se va a insertar en el ADN del vector. El vector y el segmento se unen entonces por un enlace de hidrógeno entre las colas complementarias homopoliméricas para formar moléculas de ADN recombinante.

Los enlazadores sintéticos que contienen uno o más sitios de restricción proporcionan un método alternativo de unión del segmento de ADN a los vectores. El segmento de ADN, por ejemplo, generado por digestión con endonucleasas de restricción, se trata con la ADN polimerasa T4 de bacteriófago o ADN polimerasa I de *E. coli*, enzimas que eliminan la protrusión, extremos de cadena única 3' con sus actividades 3'-5'-exonucleolíticas, y carga en los extremos 3' suspendidos con sus actividades polimerizantes.

La combinación de estas actividades genera por lo tanto, segmentos de ADN con los extremos protegidos. Los segmentos con los extremos protegidos se incuban entonces con un exceso molar mayor de moléculas enlazadoras en presencia de una enzima que es capaz de catalizar la unión de moléculas de ADN con los extremos protegidos, tal como la ADN ligasa T4 de bacteriófago. Por lo tanto, los productos de la reacción son segmentos de ADN que albergan secuencias enlazadoras poliméricas en sus extremos. Esos segmentos de ADN se escinden con enzimas de restricción y se ligan en un vector de expresión que se ha escindido con una enzima que produce extremos compatibles con los del segmento de ADN.

Los enlazadores sintéticos que contienen varios sitios de endonucleasas de restricción están disponibles en el mercado a partir de varias fuentes incluyendo International Biotechnologies Inc., New Haven, CN, USA.

Una manera deseable para modificar el ADN que codifica un polipéptido es utilizando la PCR. Este método puede utilizarse para introducir el ADN en un vector adecuado, por ejemplo, modificando sitios de restricción adecuados, o se puede utilizar para modificar el ADN de otras maneras adecuadas que se conocen en la técnica.

En este método el ADN que se va a amplificar enzimáticamente se flanquea por dos cebadores específicos que por sí mismos llegan a incorporarse en el ADN amplificado. Los cebadores específicos pueden contener sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción que se pueden utilizar para clonarse en vectores de expresión utilizando métodos conocidos en la técnica.

El ADN (o en el caso de vectores retrovíricos, ARN) se expresan entonces en un huésped adecuado para producir un polipéptido que comprende el agente de la invención. Por lo tanto, el ADN que codifica el polipéptido se puede utilizar de acuerdo con técnicas conocidas, modificadas apropiadamente en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento, para construir un vector de expresión, que se utiliza entonces para transformar una célula huésped apropiada para la expresión y producción del polipéptido. Dichas técnicas incluyen las desveladas en las Patentes de EE. UU. N° 4.440.859 presentada el 3 de abril de 1984 de Rutter et al, 4.530.901 presentada el 23 de julio de 1985 de Weissman, 4.582.800 presentada el 15 de abril de 1986 de Crowl, 4.677.063 presentada el 30 de junio de 1987 de Mark et al, 4.678.751 presentada el 7 de julio de 1987 de Goeddel, 4.704.362 presentada el 3 de noviembre de 1987 de Itakura et al, 4.710.463 presentada el 1 de diciembre de 1987 de Murray, 4.757.006 presentada el 12 de julio de 1988 de Toole, Jr. et al, 4.766.075 presentada el 23 de agosto de 1988 de Goeddel et al. y 4.810.648 presentada el 7 de marzo de 1989 de Stalker.

El ADN (o en el caso de vectores retrovíricos, ARN) que codifica un polipéptido se puede unir a una amplia variedad de otras secuencias de ADN para la introducción en un huésped apropiado. El ADN acompañante dependerá de la naturaleza del huésped, la manera de la introducción del ADN en el huésped, y si se desea el mantenimiento episómico o la integración.

En general, el ADN se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en la orientación apropiada y la fase de lectura correcta para la expresión. Si fuera necesario, el ADN se puede unir a las secuencias nucleotídicas de control reguladoras de la transcripción y la traducción que reconoce el huésped deseado, aunque dichos controles están disponibles en general en el vector de expresión. El vector entonces se introduce en el huésped mediante técnicas convencionales. En general, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar las células huésped transformadas. Una técnica de selección implica la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de ADN, con cualquiera de los elementos de control necesarios, que codifique un rasgo seleccionable en la célula transformada, tal como resistencia a antibióticos. De manera alternativa, el gen de dicho rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se utiliza para co-transformar la célula huésped deseada.

Las células huésped que han sido transformadas por el vector de expresión de la invención se cultivan entonces durante un tiempo suficiente y en condiciones adecuadas conocidas por los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas desveladas en el presente documento para permitir la expresión del polipéptido, que entonces se pueden recuperar.

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo, *Aspergillus*), células vegetales, células animales y células de insecto.

Los vectores normalmente incluyen un replicó procariota, tal como el ColE1 ori, para la propagación en procariotas, incluso si el vector se va a utilizar para la expresión en otro tipo de células, no procariotas. Los vectores pueden incluir también un promotor apropiado tal como un promotor procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y

traducción) de los genes en una célula huésped bacteriana, tal como *E. coli*, transformada con los mismos.

Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de la ARN polimerasa y se produzca la transcripción. Las secuencias promotoras compatibles con los huéspedes bacterianos a modo de ejemplo se proporcionan normalmente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un segmento de ADN de la presente invención.

Los vectores plasmídicos procariotas típicos son pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles en Biorad Laboratories, (Richmond, CA, USA) y pTrc99A y pKK223-3 disponibles en Pharmacia, Piscataway, NJ, USA.

Un vector plasmídico de célula de mamífero típico es pSVL disponible en Pharmacia, Piscataway, NJ, USA. Este vector utiliza el promotor SV40 tardío que dirige la expresión de los genes clonados, encontrándose el mayor nivel de expresión en las células productoras de antígeno T, tales como las células COS-1.

Un ejemplo de un vector de expresión inducible en mamíferos es pMSG, también disponible en Pharmacia. Este vector utiliza el promotor inducible por glucocorticoides de la repetición terminal del virus de tumor mamario de ratón para dirigir la expresión del gen clonado.

Los vectores plasmídicos útiles de levaduras son pRS403-406 y pRS413-416 y en general están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración en levaduras (Ylps) e incorpora los marcadores genéticos de levaduras *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos centroméricos de levaduras (Ycps).

Otros vectores y sistemas de expresión son bien conocidos en la técnica para su uso en varias células huésped.

En un cuarto aspecto, la invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención.

Preferentemente, la célula huésped es una célula bacteriana o es una célula de mamífero, tal como una célula humana.

La célula huésped puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas son células huésped procariotas preferidas y normalmente son una cepa de *E. coli* tal como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* DH5 disponibles en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, USA, y RR1 disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Rockville, MD, USA (Nº de ATCC 31343). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen células de levadura, de insecto y de mamífero, preferentemente células de vertebrado tal como las de un ratón, rata, mono o líneas celulares de riñón o fibroblastos humanos. Las células huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501 que están disponibles en general en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, USA. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como células CRL 1658 y 293 que son células de riñón embrionarias humanas. Las células de insecto preferidas son células Sf9 que se pueden transfectar con vectores de expresión de baculovirus.

La transformación de las células huésped apropiadas con una construcción de ADN de la presente invención se consigue por métodos bien conocidos que dependen normalmente del tipo de vector que se utilice. Con respecto a la transformación de las células huésped procariotas, véase por ejemplo, Cohen et al (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 y Sambrook et al (1989) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. La transformación de células de levadura se describe en Sherman et al (1986) Methods In Yeast Genetics, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. El método de Beggs (1978) Nature 275, 104-109 también es útil. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles en la transfección de dichas células, por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE-dextrano o formulaciones de liposomas, están disponibles en Stratagene Cloning Systems, o Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, USA.

La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar las células y se conoce bien en la técnica para transformar células de levadura, células bacterianas, células de insecto y células de vertebrados.

Por ejemplo, se pueden transformar muchas especies bacterianas por los métodos descritos en Luchansky et al (1988) Mol. Microbiol. 2, 637-646. El mayor número de transformantes se recuperan consistentemente después de la electroporación de la mezcla ADN-células suspendida en 2,6 PEB utilizando 6250 V por cm a 25 mFD.

Los métodos para la transformación de levaduras por electroporación se desvelan en Becker y Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182.

Las células transformadas satisfactoriamente, es decir, las células que contienen una construcción de ADN de la presente invención, se pueden identificar por técnicas bien conocidas. Por ejemplo, las células que resultan de la introducción de una construcción de expresión de la presente invención se pueden cultivar para producir el

polipéptido de la invención. Las células se pueden recolectar y lisar y examinar el ADN que contiene en cuanto a la presencia de ADN utilizando un método tal como el que describe Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503 o Berent et al (1985) Biotech. 3, 208. De manera alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede detectar utilizando anticuerpos como se ha descrito anteriormente.

Además, para ensayar directamente la presencia de ADN recombinante, se puede confirmar la transformación satisfactoria por métodos inmunológicos bien conocidos cuando el ADN recombinante es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, las células transformadas satisfactoriamente con un vector de expresión producen proteínas que presentan la antigenicidad apropiada.

Las muestras de células sospechosas de estar transformadas se recolectan y se ensayan en cuanto a la proteína utilizando anticuerpos adecuados.

La célula huésped puede ser una célula huésped en un cuerpo de animal no humano. Por lo tanto, se incluyen los animales transgénicos no humanos que expresan un agente de acuerdo con la invención (o un resto de unión del mismo) gracias a la presencia del transgén. Preferentemente, el animal transgénico no humano es un roedor tal como un ratón. Los animales transgénicos no humanos pueden producirse utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

En un quinto aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno, de la invención y un tampón, excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Una 'cantidad terapéuticamente eficaz', o 'cantidad eficaz' o 'terapéuticamente eficaz', como se utiliza en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración determinados. Es una cantidad pre-determinada de anticuerpo activo calculada para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con el aditivo y diluyentes necesarios, es decir, un excipiente o vehículo de administración. Además, se tiene la intención de que signifiquen una cantidad para reducir o evitar un déficit clínicamente significativo de la actividad, función y respuesta del huésped. De manera alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para producir una mejora en una afección significativa clínicamente del huésped. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad pre-determinada de la composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente necesario.

Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar por el médico o veterinario experto habituado basándose en las características del paciente, tales como la edad, peso, sexo, afección, complicaciones, otras enfermedades, etc., como se conocen bien en la técnica.

Por lo tanto, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se puede formular a distintas concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del polipéptido que se utilice. Preferentemente, la formulación comprende el polipéptido activo a una concentración de entre 0,1 μM y 1 mM, por ejemplo, entre 1 μM y 500 μM , entre 500 μM y 1 mM o entre 300 μM y 700 μM .

Por "farmacéuticamente aceptable" se incluye que la formulación es estéril y libre de pirógenos. Los vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica de farmacia. Los vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el anticuerpo de la invención y no perjudicial para los receptores de los mismos. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógenos; sin embargo se pueden utilizar otros vehículos aceptables.

Los tampones, diluyentes, vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados se conocen bien en la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

El término "tampón" pretende incluir una solución acuosa que contiene una mezcla ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Ejemplos de tampones son Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazol láctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

El término "diluyente" pretende incluir una solución acuosa o no acuosa con el fin de diluir el agente en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de entre solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, o aceite de sésamo).

- El término “adyuvante” pretende incluir cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del agente de la invención. El adyuvante puede ser uno o más de entre sales de zinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo, pero sin limitarse a fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato, y acetatos de diferentes composiciones de acilos. El adyuvante también puede ser de polímeros catiónicos tales como éteres catiónicos de celulosa, ésteres catiónicos de celulosa, ácido hialurónico desacetilado, quitosano, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos tales como el poli(vinilimidazol), y polipéptidos catiónicos tales como polihistidina, polilisina, poliarginina, y péptidos que contienen estos aminoácidos.
- El excipiente puede ser uno o más de entre carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Ejemplos de polímeros son el almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroxietil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de los mismos. ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferentes grados de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, de diferentes pesos moleculares que se añaden a la composición, por ejemplo, para el control de la viscosidad, para conseguir bioadhesión, o para proteger el lípido de la degradación química o proteolítica. Ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono, di y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, con diferentes longitudes y saturaciones de cadenas acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina hidrogenada de huevo y soja, que se añaden a la composición por razones similares a los polímeros. Ejemplos de minerales son talco, óxido magnésico, óxido de zinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como una reducción de acumulación de líquido o propiedades pigmentarias ventajosas.
- Los agentes activos basados en anticuerpos de la invención se pueden formular en cualquier tipo de composición farmacéutica conocida en la técnica que sea adecuada para el suministro de la misma.
- En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en forma de un liposoma, en el que se combina el agente, además de otros vehículos farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos adecuados para la formulación de liposomas incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares, y similares. Los lípidos adecuados también incluyen los lípidos anteriores modificados por poli(etilenglicol) en el grupo de cabeza polar para prolongar el tiempo de circulación en la circulación sanguínea. La preparación de dichas formulaciones liposómicas se puede encontrar, por ejemplo, en el documento US 4.235.871.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de microesferas biodegradables. Se han utilizado ampliamente poliésteres alifáticos, tales como ácido poli(láctico) (PLA), ácido poli(glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(carprolactona) (PCL), y polianhídridos, como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de dichas microesferas se pueden encontrar en los documentos US 5.851.451 y EP 0 213 303.
- En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma de geles de polímero, en las que los polímeros tales como el almidón, éteres de celulosa, celulosa carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa, hidroximetil celulosa, etilhidroxietil celulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de los mismos, ácido poliacrílico, imidazol polivinilo, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímero de óxido de polietileno/óxido de polipropileno, alcohol polivinílico/acetato de polivinilo de diferentes grados de hidrólisis, y polivinilpirrolidona se utilizan para densificar la solución que contienen el agente. Los polímeros comprenden también gelatina o colágeno.
- De manera alternativa, los agentes pueden disolverse simplemente en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de semilla de algodón, o aceite de sésamo), goma de tragacanto, y/o distintos tampones.
- Se apreciará que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para potenciar la acción del agente activo. De manera adicional, las composiciones se pueden someter a operaciones farmacéuticas convencionales tales como la esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, cargas, etc.
- Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada conocida por los expertos en la técnica. Por lo tanto, las vías de administración posibles incluyen la parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración a partir de implantes.
- De manera ventajosa, la composición farmacológica es adecuada para la administración en o cerca del sitio de un tumor, por ejemplo, intra-tumoral o peri-tumoral.

Se prefiere que la composición farmacéutica sea adecuada para la administración parenteral. Los métodos para formular un anticuerpo en la composición farmacéutica serán bien conocidos por los expertos en la técnica de la medicina y la farmacia. Las composiciones preferidas se describen en los Ejemplos adjuntos.

- 5 Los agentes (es decir, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo), medicamentos, y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden suministrar utilizando un sistema de suministro farmacológico de liberación sostenida inyectable. Estos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de las inyecciones. Un ejemplo de dicho sistema es Nutropin Depot que encapsula hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente durante un periodo sostenido.
- 10 Preferentemente, el suministro se lleva a cabo por vía intramuscular (i.m.) y/o subcutánea (s.c.) y/o intravenosa (i.v.).

Los agentes, medicamentos, y composiciones farmacológicas de la invención se pueden administrar mediante un dispositivo implantado quirúrgicamente que libera el fármaco directamente en el sitio necesario. Por ejemplo, el Vitrasert libera ganciclovir directamente en el ojo para tratar la retinitis CMV. La aplicación directa de este agente

15 tóxico en el sitio de la enfermedad consigue una terapia eficaz sin efectos secundarios farmacológicos sistémicos significativos.

Los sistemas de terapia por electroporación (EPT) se pueden emplear también para la administración de los agentes, medicamentos y composiciones farmacológicas de la invención. Un dispositivo que suministra un campo

20 eléctrico pulsado a las células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al fármaco, dando como resultado un aumento significativo de suministro farmacológico intracelular.

Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden suministrar por electro-incorporación (EI). La EI se produce cuando pequeñas partículas de hasta 30 micrómetros de diámetro de la

25 superficie de la piel experimentan pulsos eléctricos idénticos o similares a los que se utilizan en electroporación. En la EI, estas partículas se dirigen a través del estrato córneo y en las capas más profundas de la piel. Las partículas se pueden cargar o revestir con fármacos o genes o pueden actuar simplemente como "balas" que generan poros en la piel a través de los cuales pueden entrar los fármacos.

Un método alternativo de suministro de agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención es el sistema inyectable ReGel que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, el ReGel es un líquido inyectable que a la temperatura corporal forma inmediatamente un reservorio de gel que se erosiona lentamente y se disuelve en polímeros biodegradables, seguros, conocidos. La sustancia activa se suministra durante un tiempo

30 según se disuelven los biopolímeros.

Los agentes, medicamentos, y composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden suministrar por vía oral. El procedimiento emplea un proceso natural para la captación de vitamina B₁₂ y/o la vitamina D en el cuerpo para co-suministrar proteínas y péptidos. A caballo del sistema de captación de vitamina B₁₂ y/o vitamina D, los

35 agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden desplazarse a través de la pared intestinal. Se sintetizan complejos entre análogos de vitamina B₁₂ y/o análogos de vitamina D y el fármaco que mantiene una afinidad significativa por el factor intrínseco (IF) en la parte de vitamina B₁₂/parte de vitamina D del complejo y la bioactividad significativa de la sustancia activa del complejo.

40

Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden introducir en las células mediante "péptidos troyanos". Estos son una clase de polipéptidos denominados penetratinas que tienen

45 propiedades de translocalización y son capaces de vehicular compuestos hidrófilos a través de la membrana plasmática. Este sistema permite dirigir directamente los oligopéptidos al citoplasma y el núcleo, y puede ser no específico del tipo celular y altamente eficaz. Véase Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol. 8, 84-87.

Preferentemente, los medicamentos y/o composiciones farmacéuticas de la presente invención están en una dosificación unitaria que contiene una dosis diaria o unidad, sub-dosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

50

Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán normalmente por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una composición farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de un ácido orgánico o no orgánico no tóxico, o base, sal de adición, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y el paciente que se va a tratar, así como al

55 vía de administración, las composiciones se pueden administrar a dosis variables.

En terapia humana, los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar solos pero generalmente se administrarán mezclándolos con un excipiente, diluyente o vehículo adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración que se pretende y la práctica farmacéutica

60 convencional.

Por ejemplo, los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que

65

pueden contener agentes saborizantes y colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar por inyección intracavernosa.

- 5 Dichos comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina, desintegrantes tales como almidón (preferentemente de maíz, patata o almidón de tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica, y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxi-propilcelulosa (HPC), sacaros, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, se pueden incluir agentes lubricantes tales como
10 estearato magnésico, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

- Las composiciones sólidas o un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para las suspensiones acuosas y/o elixires, los agentes, medicamentos y composiciones
15 farmacéuticas de la invención pueden combinarse con distintos agentes edulcorantes o saborizantes, materias colorantes o colorantes, con agentes emulsionantes y/o suspensores y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

- Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía
20 parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o se pueden administrar por técnicas de infusión. Se utilizan mejor en forma de una solución acuosa estéril que contienen otras sustancias, por ejemplo, sales suficientes o glucosa para producir la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deberían ser adecuadamente tamponadas (preferentemente a un pH de desde 3 a 9), si fuera necesario. La preparación de formulaciones parenterales
25 adecuadas en condiciones estériles se consigue fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

- Los medicamentos y composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones por inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y
30 solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor que se pretende; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Los medicamentos y composiciones farmacéuticas pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y se pueden almacenar en condiciones de secado por congelación (liofilizado) que solo necesitan la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección inmediatamente antes de su uso. Las
35 soluciones y suspensiones de la inyección extemporánea se puede preparar a partir de polvos estériles, gránulos, y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

- Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación y se suministran convenientemente en forma de un inhalador de polvo seco o una
40 presentación de pulverizador en aerosol de un contenedor presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionar una válvula para suministrar una cantidad medida. El envase presurizado, bomba,
45 pulverizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del agente activo, por ejemplo, utilizando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Las cápsulas y cartuchos (fabricados, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular para que contengan una mezcla de polvo o un agente de la invención y una base de polvo adecuada tal como de lactosa o almidón.

- 50 De manera alternativa, los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en forma de un supositorio o pesario, o se pueden aplicar de manera tópica en forma de una loción, solución, crema, gel, ungüento o polvo fino. Los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche cutáneo.
55 Se pueden administrar por vía ocular, particularmente para el tratamiento de enfermedades del ojo.

- Para su uso oftálmico, los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular como suspensiones micronizadas en solución salina estéril, isotónicas, con el pH ajustado, o preferentemente, como soluciones en solución salina estéril, con el pH ajustado, isotónicas, en combinación
60 opcionalmente con un conservante tal como el cloruro de benzalconio. De manera alternativa se pueden formular en un ungüento tal como vaselina.

- Para la aplicación tópica en la piel, los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular como un ungüento adecuado que contenga el principio activo suspendido o disuelto en, por
65 ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, agente polioxietileno polioxipropileno, cera emulsionante y agua. De manera alternativa, se pueden

formular como una loción adecuada o crema, suspenderse o disolverse en, por ejemplo, una mezcla de uno de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

- 5 Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el ingrediente activo en una base de saborizante, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; comprimidos que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

- 10 En general, en seres humanos, los agentes, medicamentos, y composiciones farmacéuticas de la invención en o cerca del sitio de un tumor es la vía preferida, en particular la administración intra-tumoral, o peri-tumoral.

- Para su uso veterinario, los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención se administran como una formulación aceptable adecuada de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que será más apropiado para un animal en particular.

- En un sexto aspecto, la invención proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la invención.

- En un séptimo aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con un segundo aspecto de la invención, o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, o una célula huésped de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, o una composición de acuerdo con el quinto aspecto de la invención, para su uso en medicina.

- En un octavo aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, o un vector de acuerdo con el tercer aspecto de la invención, o una célula huésped de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con el quinto aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento del cáncer.

- Preferentemente, en el séptimo y octavo aspectos de la invención, el tratamiento del cáncer comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, o una variante, fusión o derivado del mismo o una molécula de ácido nucleico o el vector o las células huésped o la composición farmacéutica a un individuo que necesita los mismos.

- Se prefiere que, en el séptimo y/u octavo aspectos de la invención, la etapa de administración a un individuo que necesita los mismos comprende la administración local, por ejemplo, la administración local a un tumor en un paciente (por ejemplo, intra-tumoral o peri-tumoral).

- Se sabe que dicha inyección local en un tumor o un anticuerpo anti-CD40 puede generar un efecto anti-tumoral sistémico a una dosis mucho más baja (van Mierlo et al., 2002, Proc Natl Acad Sci USA, 99: 5561-5566; Kalbasi et al., 2010, J Immunotherapy, 33: 810-816). Además, se ha expuesto que los ratones tratados vía intra-tumoral en un flanco eran capaces de aclarar tumores en el flanco opuesto, y que el efecto anti-tumoral depende de la activación de células dendríticas, y la activación posterior de una respuesta de linfocitos T citotóxicos. Además, el tratamiento producía una inmunidad protectora al re-desafío con el tumor.

- Después de la optimización específica del paciente de la dosis del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, o una variante o fusión o derivado del mismo, se administra entonces al paciente la dosis terapéutica máxima para la duración del tratamiento. Sin embargo, se apreciará que la dosis se puede disminuir durante el tiempo una vez que comienza el tratamiento para tener el efecto terapéutico deseado.

- Normalmente, la dosis terapéutica del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno, o una variante, fusión o derivado del mismo, en un paciente humano estará en el intervalo de 100 µg a 700 mg por administración (basado en un peso corporal de 70 kg).

- Por ejemplo, la dosis máxima terapéutica puede estar en el intervalo de 0,1 a 10 mg/kg por administración, por ejemplo, entre 0,1 y 5 mg/kg o entre 1 y 5 mg/kg o entre 0,1 y 2 mg/kg. Se apreciará que dicha dosis se puede administrar en diferentes intervalos, según determine el oncólogo/médico; por ejemplo, una dosis se puede administrar diariamente, dos veces a la semana, semanalmente, bi-semanalmente o mensualmente.

- En una realización, la dosis terapéutica máxima del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo, es una dosis baja. Por ejemplo, la dosis que se va a administrar por vía local en la presente invención puede ser menor del 25 % de la dosis sistémica típica del mismo agente necesario para producir un efecto terapéutico. En una realización, la dosis es menor o igual a 1 mg por administración, por ejemplo menor o igual a 500 µg, 400 µg, 300

µg, 200 µg, 100 µg, 50 µg, 30 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg o 1 µg por administración. Se apreciará que dichas dosis se pueden administrar repetidamente al paciente durante el tiempo, por ejemplo dos veces al día, una vez al día, una vez día sí y día no, dos veces a la semana, una vez a la semana, dos veces al mes, una vez al mes, etc.).

- 5 En una realización, el agente basado en anticuerpo se utiliza a una dosis de 10 µg a 100 µg por administración.

Por ejemplo, el agente basado en un anticuerpo se puede utilizar a una dosis de 20 µg a 40 µg por administración, por ejemplo, 30 µg por administración.

- 10 En una realización, el agente basado en anticuerpo es capaz de proporcionar un efecto anti-tumoral sistémico tal como un efecto anti-tumoral sistémico que se puede conseguir incluso si la terapia es local/intra-tumoral. Cuando se administra un anticuerpo inmunoterápico localmente, por ejemplo, por inyecciones intra-tumorales, solo las células del área del tumor son direccionadas por la terapia de CD40. Por lo tanto, se pretende que solo la concentración del agonista del CD40 en el área del tejido ejerza sus efectos de influencia del nivel de activación de CD40. Cuando se
15 administra localmente, la dosis óptima se puede determinar por el volumen de área de tejido que es relevante para tratar y no el peso corporal del paciente. Cuando el tratamiento es intra-tumoral, este volumen puede definirse a su vez por el volumen tumoral. La dosis total relevante puede ser por lo tanto menor que la del tratamiento sistémico, y se puede definir basándose en el diagnóstico del tumor por exploración PET u otros métodos de creación de imágenes, más que por el peso del paciente.

- 20 Se apreciará que los agentes basados en anticuerpo de la invención son adecuados para su uso en el tratamiento de cualquier tipo de cáncer para el que la activación de CD40 puede proporcionar un beneficio terapéutico.

- 25 Por ejemplo, el cáncer se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en: cáncer de próstata; cáncer de mama; cáncer colorrectal; cáncer pancreático; cáncer ovárico; cáncer de pulmón; cáncer de cuello uterino; rabdomiosarcoma; neuroblastoma; neuroblastoma; mieloma múltiple; leucemia; leucemia linfoblástica aguda; melanoma; cáncer de vejiga y glioblastoma.

- 30 En una realización, el cáncer se asocia con células tumorales CD40⁺. Sin embargo, los agentes basados en anticuerpo de la invención se pueden utilizar también en el tratamiento de cánceres asociados con células tumorales CD40⁻.

- 35 Se apreciará adicionalmente que los agentes basados en anticuerpo de la invención se pueden utilizar como el único tratamiento para el cáncer o como parte de un tratamiento de combinación (cuyo tratamiento adicional puede ser un agente farmacéutico, radioterapia y/o cirugía).

Por lo tanto, el paciente también puede recibir uno o más tratamientos adicionales para el cáncer, por ejemplo agentes farmacéuticos (tales como agentes quimioterápicos), radioterapia y/o cirugía.

- 40 En una realización, el uno o más tratamientos adicionales se seleccionan de entre el grupo que consiste en agentes quimioterápicos convencionales (tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas y terpenoides, inhibidores de la topoisomerasa y antineoplásicos), agentes radioterápicos, agentes terapéuticos basados en anticuerpos (tales como gemtuzumab, alemtuzumab, rituximab, trastuzumab, nimotuzumab, cetuximab, bevacizumab), y esteroides.

- 45 También se describen en el presente documento un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la invención, comprendiendo el método de cultivar una célula huésped de acuerdo con el cuarto aspecto de la invención en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo codificado o el fragmento de unión al antígeno del mismo.

- 50 Los métodos de cultivo de células huésped y el aislamiento de proteínas recombinantes son bien conocidos en la técnica. Se apreciará que, dependiendo de la célula huésped, las proteínas producidas pueden diferenciarse. Por ejemplo, ciertas células huésped, tales como células de levadura o bacterianas incluso si no tienen o si tienen diferentes sistemas de modificación post-traduccional que pueda resultar en la producción de formas de agentes de
55 la invención (o restos de unión de los mismos) que se pueden modificar después de la traducción de manera diferente.

- Se prefiere que los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de la invención (o los restos de unión de los mismos) se produzcan en un sistema eucariota, tal como una célula de mamífero.

- 60 De acuerdo con una realización menos preferida, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de la invención se pueden producir *in vitro* utilizando un sistema disponible en el mercado de traducción *in vitro*, tal como un lisado de reticulocitos de conejo o un lisado de germen de trigo (disponible en Promega). Preferentemente, el sistema de traducción es un lisado de reticulocitos de conejo. Convenientemente, el sistema de traducción se
65 puede acoplar a un sistema de transcripción, tal como el sistema de transcripción-traducción TNT (Promega). Este sistema tiene la ventaja de producción de una transcripción de ARNm a partir de un polinucleótido de ADN

codificante en la misma reacción que la traducción.

Se apreciará que cuando el agente comprende distintos restos, por ejemplo dominios de unión y/o citotóxicos, estos restos pueden ser codificados por uno o más moléculas de ácido nucleico diferentes.

Preferentemente, el método de producción comprende una etapa adicional de aislamiento de los anticuerpos y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, de la invención producidos a partir de la célula huésped o a partir de la mezcla de traducción *in vitro*. Preferentemente, el aislamiento emplea un anticuerpo que se une selectivamente se une al polipéptido expresado de la invención.

Los métodos para producir anticuerpos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos en un animal inmunizándolo con un péptido apropiado. De manera alternativa, con la tecnología actual, es posible fabricar anticuerpos sin necesidad de utilizar animales; dichas técnicas incluyen, por ejemplo, tecnología de fago de presentación que se conoce bien en la técnica.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención es el producto, directa o indirectamente, de la optimización proteica *in vitro* (por ejemplo, utilizando tecnología FIND® de Alligator Bioscience AB, como se describe en los documentos 02/48351 y WO 03/097834).

La enumeración o discusión en la presente memoria descriptiva de un documento publicado aparentemente anterior no debería tomarse necesariamente como el reconocimiento de que el documento sea parte del estado de la técnica o que sea de conocimiento general.

Los ejemplos preferidos, no limitantes que representan ciertos aspectos de la invención serán descritos ahora, en referencia a las siguientes figuras:

Figura 1 - (A) "Mapa caliente" de las bibliotecas y el resultado de las selecciones respecto a la exploración de alto rendimiento (HTS) Cada cuadro representa una posición de aminoácido. Los mapas calientes se restringen a las posiciones en las que se han introducido y/o encontrado las mutaciones por análisis de secuencia. No se representa el enlazador entre V_H y V_L . La frecuencia de mutaciones en cada posición se indica por una sombra más oscura. (B9 Número de posiciones con más de 5 mutaciones que se calculan basándose en las secuencias a partir del procedimiento de selección.

Figura 2 - Visualización de los resultados de HTS. La relación entre las dos mediciones por ELISA (lavado normal y lavado fuerte) se representa en el eje Y; en el eje X, se representa la señal de unión del ELISA primario (lavado normal). Cada esfera del gráfico representa los datos de un clon. Se muestran el B44 (gris) y los clones de la ronda de selección número 5 (negro).

Figura 3 – Diagrama esquemático de los dominios CD40.

Figura 4 – Análisis de resonancia de plasmones superficiales de los clones de anticuerpo CD40 que se unen a la diana a 37 °C y pH fisiológico.

Figura 5 – Regulación positiva del marcador de superficie, CD86, por los clones de anticuerpo CD40 con respecto al anticuerpo B44.

Figura 6 – Se representa el peso de los tumores medido en el último día (día 28). Se presenta el tratamiento con 30 ug de G12 o isotipo de control (** $p < 0,01$ para ambos grupos de tratamiento en comparación con el control utilizando el ensayo de Mann-Whitney, de dos colas).

Figura 7 – Se representa el volumen tumoral medio ($n = 9$) de los diferentes grupos de tratamiento (+/- SEM). Los ratones tratados con 30 ug de fármaco se comparan con el isotipo de control (30 ug). El tratamiento con G12 proporciona un efecto anti-tumoral significativo en comparación con el isotipo de control.

Figura 8 – Se representa el peso de los tumores medidos en el último día (día 28). Se compara el G12 con el tratamiento con PBS en presencia de células dendríticas y células T humanas, con cualquiera de los grupos de tratamiento ($n = 10$) injertados con células T autólogas y células dendríticas de dos donantes diferentes (cinco ratones de cada donante, diez ratones en total). El tratamiento con G12 era significativo en comparación con el isotipo de control ($p < 0,05$ para el grupo de tratamiento en comparación con el control utilizando el ensayo t de Student, de dos colas).

Figura 9 – Se representa el volumen tumoral medio ($n = 10$) de los grupos de tratamiento (+/- SEM). Se trataron los ratones con 30 ug de G12 y se comparó con el tratamiento con PBS en presencia de células dendríticas y células T humanas, cualquiera de los grupos de tratamiento ($n = 10$) injertados con células T y células dendríticas autólogas de dos donantes diferentes (cinco ratones por cada donante, diez ratones en total). El tratamiento con G12 era significativo en comparación con el isotipo de control.

Figura 10 – Se presentan las curvas de supervivencia de ratones inoculados con el tumor que se tratan con los fármacos. El tratamiento con G12 aumentaba significativamente la supervivencia de los animales en comparación con el isotipo de control ($p < 0,013$). La curva de supervivencia de los ratones tratados con G12 en comparación con S2C6 ($p < 0,13$). La supervivencia de los ratones tratados con S2C6 en comparación con el isotipo control ($p < 0,088$). Cada grupo de tratamiento consistía en 5 ratones, $N = 5$.

Figura 11 – Se presentan las curvas de supervivencia de los ratones que albergan el tumor tratados con los fármacos. Las curvas de supervivencia representadas se basan en datos agrupados. El grupo de ratones tratados con G12 y con el isotipo de control consistían en 20 animales en cada uno de los grupos. Los ratones tratados con S2C6 consistían en 12 animales. La curva de supervivencia del grupo tratado con G12 y el grupo tratado con S2C6 se comparó con el grupo tratado con el isotipo de control mediante el ensayo de rango logarítmico utilizando el método Bonferroni para ajustar las comparaciones múltiples. La curva de supervivencia de G12 es significativamente diferente en comparación con el isotipo de control ($p 0,004$ sin ajustar).

Figura 12 – Se representan los niveles de citocinas en ratones tratados. Las muestras de suero se tomaron 4 h después del segundo tratamiento el día 10 de ratones tratados y se analizaron en cuanto a niveles de citocinas. Los niveles de citocinas en ratones tratados con G12, S2C6 e isotipo de control se compararon utilizando Anova de una vía con el ensayo de comparaciones múltiples de Bonferroni para calcular los valores de p ajustados. El tratamiento con G12 es significativo en comparación con los ratones tratados con S2C6. Los niveles de citocinas marcados con *** presentaban una $p < 0,001$, los datos marcados con ** presentaban un valor de p de $0,001 < p < 0,01$, y los niveles de citocinas marcados con * representaban un valor de p de $0,01 < p < 0,05$. El grupo de tratamiento de G12 y el grupo de tratamiento de S2C6 consistían en 23 ratones, $N = 23$. El grupo de tratamiento con el isotipo de control consistía en 18 ratones, $N = 18$.

Figura 13 – Niveles de anticuerpo en el suero de ratones tratados. Se analizaron las muestras de suero tomadas 4 h después del primer tratamiento (día 7) y el segundo (día 10) con G12 o los controles en cuanto a niveles de anticuerpos. El día 7 y 10, el título de anticuerpo era significativamente menor, aproximadamente de dos veces, para el clon G12 de anticuerpo anti-CD40 en comparación con el clon S2C6. El título de G12 en el suero era aproximadamente 100 veces menor en comparación con el isotipo de control debido a los efectos relacionados con la diana, (el título de G12 es similar al título de isotipo en ratones negativos a CD40 humano).

Después del tratamiento con dosis idénticas (30 μ g) de G12 y S2C6 hay una diferencia significativa en los títulos de suero de G12 y S2C6 4 horas después del tratamiento. Esto indica que el G12 se retiene más tiempo en el tumor y tejido circundante en comparación con S2C6. Esta diferencia puede ser el resultado de la alta velocidad de asociación de G12 y la afinidad por la diana (CD40) en comparación con otros anticuerpos de CD40, por ejemplo, S2C6.

Los niveles de anticuerpo marcados con *** representan una $p < 0,001$, los datos marcados con ** representan un valor de p de $0,001 < p < 0,01$, y los niveles de citocinas marcados con * representan un valor de p de $0,01 < p < 0,05$. El grupo de tratamiento de G12 y el grupo de tratamiento de S2C6 consistían en 23 ratones, $N = 23$. El grupo de tratamiento con el isotipo de control consistía en 18 ratones, $N = 18$.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Evolución dirigida de un anticuerpo CD40 agonista con potencia mejorada

Introducción

El anticuerpo B44 se origina de la biblioteca n-CoDeR®, que es una librería de presentación de fragmentos de anticuerpo humano (Söderlind et al., 2000). Las secuencias de aminoácidos y un modelo de estructura del anticuerpo agonista B44 anti-CD40 se utilizó para diseñar las bibliotecas, excepto en una biblioteca, en la que se insertaron mutaciones aleatorias a lo largo de la secuencia completa.

Los anticuerpos de la invención se prepararon y se seleccionaron de la siguiente manera.

Diseño de la biblioteca

Se construyeron tres bibliotecas diseñadas y una biblioteca aleatoria basándose en el análisis de secuencia y el modelo de estructura del anticuerpo B44. El modelo de estructura de B44 se basaba en estructuras de matriz adecuadas, 1NL0 para V_H y 2J6E para V_L , en el banco de datos proteico (PDB).

Se identificaron los restos de punto caliente de la línea germinal en AL-10013-04 (véase LeFranc et al, IMGT/VQUEST, http://www.imgt.org/IMGT-education/Tutorials/IGandBcells/_UK/SomaticHypermutations/) de B44 por análisis de secuencia de nucleótidos (Ho y Pastan "Therapeutic antibodies: Methods and protocols", 2009, (525) Humana Press). Las mutaciones de puntos calientes de la línea germinal son posiciones de aminoácido en los dominios variables de inmunoglobulina reordenados que tienen tendencia a sufrir mutaciones durante el

procedimiento de hipermutación somática. Los restos de punto caliente en la línea germinal en CDRL3 se disponen aleatoriamente a lo largo de los restos de punto caliente de la línea germinal seleccionados en la adyacente estructuralmente CDRL1. La variabilidad en cada una de las mutaciones de punto caliente de la línea germinal estaba restringida a 8-9 restos seleccionados para reducir la complejidad y generación de una biblioteca altamente funcional. Estos restos se seleccionaron para representar las propiedades fisicoquímicas de todos (20) los aminoácidos de origen natural (Tanping, Protein Engineering, 2003, 16, 323-330) (Koide et al, 2009, ACS Chemical biology), mientras que se mantiene la complejidad y variabilidad teórica en un nivel conveniente. La variabilidad teórica de esta biblioteca era de $1,9 \times 10^7$ variantes individuales.

En AL-10013-05, se identificaron todos los restos de CDR expuestos en la superficie basándose en el modelo de estructura de B44. Estos restos varaban, restringiendo la variabilidad a 1 o dos restos homólogos, excepto en H3 en el que se introdujo una variabilidad adicional (véase la Figura 1). El propósito era crear una biblioteca altamente funcional, mientras se mantenía la complejidad y variabilidad teórica a un nivel conveniente. La variabilidad de esta biblioteca era de $1,9 \times 10^7$ variantes individuales.

La biblioteca diseñada AL-10013-06, los restos en la parte central de CDRL3 y los restos en la CDRH2 adyacente estructuralmente estaban aleatorizados ($n = 11$). Los restos se identificaron a partir del modelo de estructura de B44. La variabilidad de cada posición se restringía a 4-5 restos seleccionados para representar las propiedades fisicoquímicas adecuadas para generar una alta afinidad, "minimalista", epítipo de unión proteica (Koide et al 2009, ACS Chemical biology, Fellouse et al., 2007, J Mol Biol)^{1, 2}, mientras que se mantiene la complejidad de la variabilidad teórica en un nivel conveniente. La biblioteca AL-10013-06 contiene $1,6 \times 10^7$ variantes únicas.

En la biblioteca aleatorizada AL-10013-07, la secuencia de B44 completa se aleatorizó utilizando un método de PCR con tendencia al error diseñada para minimizar la tendencia mutacional (Genemorph). El tamaño de biblioteca generado era de $6,3 \times 10^8$ variantes únicas.

Estrategia de selección

Las bibliotecas de partida se enriquecieron con enlazadores para el Fcγ-CD40 biotinilado creando un agrupamiento de secuencias de cada biblioteca que codifique los enlazadores funcionales ("Ronda 1" en la Tabla 1). El enriquecimiento inicial para los enlazadores se verificó por secuenciación.

Las secuencias de los agrupamientos que codifican las variantes funcionales se recombinaron posteriormente utilizando FIND®. La tecnología FIND® de Alligator Bioscience AB se describe en los documentos WO 02/48351 y WO 03/097834.

La biblioteca recombinada con FIND® comprendía 2×10^8 variantes únicas.

La biblioteca recombinada con FIND® producida se sometió a cuatro rondas de selección adicionales ("Rondas 2 a 5" en la Tabla 1).

De cada ronda de selección, se seleccionaron aproximadamente 2.000 clones y se exploraron en un ensayo de alto rendimiento. El protocolo de selección para la maduración de afinidad incluía las etapas de impacto de las siguientes propiedades: afinidad; velocidad de asociación; velocidad de disociación; multimerización; y mantenimiento del epítipo.

- Con el fin de aumentar la afinidad, se incluyó una disminución de diez veces de la concentración de antígeno en tres rondas, seguido por una disminución de cinco veces de la concentración de antígeno en dos rondas.

- La velocidad de asociación se diseñó para mantenerse, y se dirigió acortando el tiempo de incubación.

- La velocidad de disociación se diseñó para mejorarse aumentando la rigurosidad de lavado. El CD40 no biotinilado se incluyó en las rondas 4 y 5 para evitar la multimerización y suprimir la selección por avidez.

Los resultados de la selección de la exploración primaria de alto rendimiento se resumen en los "mapas calientes" de las bibliotecas que muestran la posición y frecuencia de las mutaciones generadas en cada biblioteca (Figura 1A).

La Figura 1 B demuestra cómo la tecnología de recombinación FIND® disminuye el número de restos mutados a la vez que mejoran la afinidad.

Tabla 1: Estrategia de selección

Ronda	Conc. de Ag (nM)	Incubación (min)^a	Lavado (min)^b
1	10	60/30	Convencional
2	1	20/30	Convencional

3	0,1	10/20	Convencional + 10
4	0,02	5/10/20	Convencional + 30
5	0,004	5/10/15	Convencional + 120
^a el tiempo de incubación se muestra por: tiempo de incubación con CD40 biotinilado/tiempo adicional de incubación con CD4 no biotinilado en la ronda 4 y 5/tiempo de incubación permitido para rescatar los complejos fago/antígeno en perlas magnéticas. ^b El lavado convencional comprende siete lavados utilizando el tampón de selección (PBS-T/BSA) seguidos por cuatro lavados con PBS. El protocolo se extendió en la ronda 3-5 añadiendo una incubación prolongada (tiempo dado en minutos).			

Exploración de alto rendimiento (HTS)

De cada ronda de selección, se seleccionaron y exploraron aproximadamente 2.000 clones en un ensayo de alto rendimiento.

El ensayo de exploración de alto rendimiento se diseñó de la siguiente manera: se llevó a cabo un método de medición de la velocidad de disociación en dos condiciones de lavado diferentes en un ensayo de unión ELISA. La velocidad de disociación mejorada se correlacionaba con el aumento de la relación de las dos mediciones. Los resultados del ensayo de alto rendimiento se representaron por la relación medida frente a la señal de unión en el ELISA (Figura 2).

El ensayo HTS se basaba en un ELISA sándwich que medía la unión del fragmento scFv-his en sobrenadantes de *E. coli* en bruto a placas de microtitulación revestidas con CD40.

Se revistieron placas White 394 de fondo plano de alta unión (Greiner nº 781074) con CD40mFc (Apollo nº 9025H) por incubación durante 2 horas a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron (tampón de lavado: PBS + un 0,05 % de Tween 20 (PBST), Medicago nº 09-9410-100, lavadora de microplacas ELx405 (BioTek) y entonces se bloqueó con PBST + un 3 % de leche en polvo (Semper). Las placas se lavaron de nuevo y se añadieron las muestras o los controles a los pocillos. Las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y después se lavaron utilizando o un lavado normal (ciclos de 3 lavados) o lavado fuerte (ciclos de 3 lavados seguido por incubación con PBST 30 min seguido por ciclos de 3 lavados).

Se añadió Detection Ab, Penta-His-HRP (Qiagen nº 1014992) y se desarrollaron las placas posteriormente utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico (Thermo nº 37069) y se detectó con el lector Envision (Perkin Elmer).

Ejemplo 2 – Afinidad mejorada de los anticuerpos anti-CD40 a modo de ejemplo

Los anticuerpos anti-CD40 recombinados con FIND® se seleccionaron por su afinidad mejorada (KD) por el receptor CD40. La afinidad de los anticuerpos anti-CD40 por la diana se determinó por resonancia de plasmones superficiales y las constantes cinéticas calculadas se muestran en la Tabla 1 y Tabla 2. Las afinidades se mejoraron aproximadamente cien veces para los clones de anticuerpo anti-CD40 en comparación con el anticuerpo B44 original, Tabla 2 y Figura 3, a pH fisiológico y 37 °C.

La afinidad mejorada por los clones de anticuerpo anti-CD40 se observaba también a pH bajo, Tabla 2. La resonancia de plasmones superficiales se utilizó para determinar las constantes cinéticas a pH 5,4 y 37 °C, y se compararon con las del anticuerpo B44.

Los resultados muestran que las afinidades totales solo estaban afectadas moderadamente por la disminución del pH a 5,4, y que el aumento de afinidad en comparación con B44 se mantenía (aunque las velocidades de disociación y de asociación se cambiaron individualmente). Esto puede tener un beneficio clínico para la inmunoterapia local utilizando la invención.

Materiales y métodos

Determinación de los parámetros cinéticos y las constantes de afinidad por resonancia de plasmones superficiales

Se llevaron a cabo las mediciones de la afinidad de anticuerpos purificados por resonancia de plasmones superficiales utilizando un instrumento Biacore 3000 de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se inmovilizó el CD40hfc (R&Dsystems, USA) en el chip sensor BIAcore, CM5, utilizando un acoplamiento amina convencional. Los anticuerpos anti-CD40 de la invención (diluidos en serie 1/3 de 1-0,012 nM) se analizaron en cuanto a la unión en HBS-P (GE, BR-1003-68) con un caudal de 30 µl/min a 37 °C y pH 7,3. La asociación se siguió

durante 3 minutos y la disociación durante 10 minutos. Se llevó a cabo la regeneración dos veces utilizando 50 mM de NaOH durante 30 segundos. Los parámetros cinéticos y las constantes de afinidad se calcularon utilizando el software BIAevaluation 4.1.

- 5 De manera alternativa, se incubaron las muestras en tampón de acetato pH 5,4, 10 mM de Acetato, 150 mM de NaCl, un 0,005 % de T20, a 37 °C.

Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

10 Resultados

Tabla 2. Constantes cinéticas para la interacción entre el receptor de CD40 inmovilizado y los clones de anticuerpo anti-CD40 en comparación con B44 a pH fisiológico según se determina por resonancia de plasmones superficiales

Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
B44	$2,7 \times 10^6$	$4,5 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^{-9}$
A4	$7,3 \times 10^6$	$7,6 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-11}$
A5	$8,5 \times 10^6$	$9,6 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-11}$
F6	11×10^6	$3,2 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-11}$
F9	$2,8 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-5}$	$4,3 \times 10^{-11}$
G12	$9,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-11}$
H12	11×10^6	$4,9 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-11}$
B9	$8,5 \times 10^6$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-11}$
C4	$7,5 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-11}$
H11	$8,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^{-4}$	$1,6 \times 10^{-11}$

- 15 **Tabla 3.** Constantes cinéticas para la interacción entre el receptor de CD40 inmovilizado y los clones de anticuerpo anti-CD40 en comparación con B44 a pH = 5,4 según se determina por resonancia de plasmones superficiales

Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
B44	$6,0 \times 10^6$	$5,5 \times 10^{-3}$	$9,3 \times 10^{-10}$
A4	$1,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-11}$
A5	$1,1 \times 10^7$	$2,5 \times 10^{-4}$	$2,2 \times 10^{-11}$
G12	$9,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-11}$
H12	11×10^6	$4,9 \times 10^{-5}$	$4,5 \times 10^{-11}$
B9	$9,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-11}$
K_a , constante de velocidad de asociación; k_d , constante de velocidad de disociación, KD , constante de afinidad			

Ejemplo 3 – Mapeo de epítipo y reactividad cruzada de anticuerpos a modo de ejemplo de la invención

El receptor de CD40 consiste en cuatro dominios extracelulares, cada uno compuesto por dos tipos de unidades modulares (Naismith y Sprang, 1998, Trends Biochem, (23) 74-79) y cada módulo está estabilizado por uno o dos enlaces disulfuro. Con el fin de analizar la especificidad más precisa de los scFv seleccionados, se determinó la localización de cada epítipo de scFv por mapeo de dominios. La capacidad de los fragmentos scFv para unirse a las construcciones CD40 truncadas, expresados en la superficie de células COS-7 o L transfectadas se midió utilizando el análisis FACscan (como se describe por Ellmark et al 2002, Immunology). Los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención eran capaces de unirse a construcciones en los que el primer módulo se había retirado (D1/B2), pero no a construcciones que tenían el primer dominio de CD40 completo (véase la Figura 4 y la Tabla 4).

Tabla 4

	G12	A4	A5	C4	B44	H11
D1	+	+	+	+	+	+
D1/B2	+	+	+	+	+	+
D2	-	-	-	-	-	-
D2/B1	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	-	-

Especificidad cruzada

- 5 Los clones de la invención tienen reacción cruzada con CD40 de mono Cynomolgus, macaco Rhesus y otras especies de macaco. No tienen reacción cruzada con CD40 murino ni canino.

Ejemplo 4 – Regulación positiva de moléculas de superficie de células dendríticas por anticuerpos anti-CD40 a modo de ejemplo

- 10 La unión con el receptor CD40 induce la activación de células dendríticas, que da lugar potencialmente a la activación de respuesta de células T antitumorales específicas. Las células dendríticas derivadas de monocitos tratadas con un anticuerpo anti-CD40 presentan una regulación positiva de las moléculas de superficie CD80, CD83, CD86, y HLA-DR. La regulación positiva de las moléculas, CD80 y CD86, son necesarias en la co-estimulación de la
- 15 activación de células T.

Otros anticuerpos agonistas de CD40, por ejemplo, CP-870.893, tiene una potencia aproximadamente 20 veces mayor para la activación de las células B que para la activación de las células dendríticas (Gladue et al., 2011, Cancer Immunol Immunother 60[7]; 1009-1017).

- 20 La activación de las células dendríticas es más relevante clínicamente que la activación de las células B, y el efecto sobre las células B puede dar como resultado una toxicidad limitante de la dosis a una dosis de tratamiento que no activa las células dendríticas, mientras que se mantiene la potencia de la activación de las células B en el mismo intervalo. Los clones descritos en la invención tienen una potencia para la activación de células B que está en el
- 25 mismo intervalo que la activación de las células dendríticas, lo que puede proporcionar ventajas clínicas.

- La mejora de la potencia de los clones de anticuerpo anti-CD40 para promover la activación de células dendríticas en comparación con el anticuerpo anti-CD40 original, el B44, se determinó por ensayos *in vitro*. Se observó una potencia mejorada en los clones de anticuerpo anti-CD40 en la activación de células dendríticas según se determina
- 30 por la regulación positiva de las moléculas de superficie CD86.

La Tabla 5 resume los resultados de estos estudios de expresión de marcadores de superficie.

- 35 En la Figura 5A y B, se muestra la expresión de CD86 y su dependencia de la concentración.

Materiales y métodos*Ensayo de activación de células dendríticas*

- 40 Las células dendríticas se derivaban de monocitos de sangre periférica. En resumen, las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se separaron de la capa leucocitaria de sangre completa por gradiente de Ficoll y se aislaron los monocitos CD14+ con microperlas CD14+ MACS (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CD14+, que alcanzaban ~ 95 % de pureza cuando se cultivaban en medio RPMI + un 10 % de FCS, 150 ng/ml GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 a 37 °C durante seis días a una concentración de 1×10^6 células/ml.
- 45 Se reemplazó un 80 % del medio con medio reciente y citocinas después de tres días de cultivo.

- Después de seis días de cultivo las células tenían el CD14 regulado negativamente y el CD1a regulado positivamente. Entonces se lavaron, se suspendieron en medio con citocinas recientes y con seres de dilución de anticuerpos estimulantes. Las células se cultivaron a una concentración de 667000 células/ml y anticuerpos desde
- 50 3,3 – 0,013 µg/ml. Los anticuerpos estimulantes eran B44 y ocho clones A4, A5, B9, C4, F6, G12, H11 y H12. Las células dendríticas se cultivaron a 37 °C durante 48 horas adicionales. Después se analizaron los marcadores de la activación CD86, CD80 y HLA-DR por FACS.

Tabla 5: Media de la CE50 y veces de aumento máximas de expresión CD86, CD80, y MHC II de clones de la invención y B44

	ANTICUERPO ANTI-CD40 G12 CE50 (µg/ml) (media +/- d.est.)	ANTICUERPO ANTI-CD40 G12 Aumento de veces máximo (media +/- d.est.)
CD86	0,09 +/- 0,056	136 +/- 72,6
CD80	0,09 +/- 0,056	292 +/- 205
MHC II	0,14 +/- 0,078	864 +/- 450
	ANTICUERPO ANTI-CD40 A4 CE50 (µg/ml) (media +/- d.est.)	ANTICUERPO ANTI-CD40 A4 Aumento de veces máximo (media +/- d.est.)
CD86	0,13 +/- 0,08	149 +/- 79,5
CD80	0,17 +/- 0,047	599 +/- 87,8
MHC II	0,14 +/- 0,08	851 +/- 485
	ANTICUERPO ANTI-CD40 C4 CE50 (µg/ml) (media +/- d.est.)	ANTICUERPO ANTI-CD40 C4 Aumento de veces máximo (media +/- d.est.)
CD86	0,11 +/- 0,050	164 +/- 101
CD80	0,031 +/- 0,0007	609 +/- 136
MHC II	0,04 +/- 0,014	395 +/- 252
	ANTICUERPO ANTI-CD40 H11 CE50 (µg/ml) (media +/- d.est.)	ANTICUERPO ANTI-CD40 H11 Aumento de veces máximo (media +/- d.est.)
CD86	0,14 +/- 0,056	195 +/- 88
CD80	0,14 +/- 0,056	641 +/- 37
MHC II	0,22 +/- 0,15	481 +/- 122
	ANTICUERPO ANTI-CD40 B44 CE50 (µg/ml) (media +/- d.est.)	ANTICUERPO ANTI-CD40 B44 Aumento de veces máximo (media +/- d.est.)
CD86	0,37 +/- 0,21	132 +/- 81
CD80	0,25 +/- 0,14	584 +/- 73
MHC II	0,51 +/- 0,20	811 +/- 684

Ejemplo 5 – Aumento de secreción de IFN-γ por las células T activadas inducidas por anticuerpos anti-CD40

Se estudió la activación de células T *in vitro* por las células dendríticas estimuladas por los clones de anticuerpos anti-CD y se analizó la producción de IFN-γ.

Los resultados se resumen en la Tabla 6.

La potencia de los clones de anticuerpo anti-CD40 mejoraba en comparación con el anticuerpo B44 en el ensayo de células T alogénicas y células dendríticas.

Materiales y métodos***Ensayo de activación de células T alogénicas por células dendríticas***

Las células dendríticas se derivaron de los monocitos de sangre periférica como se describe en el ensayo de activación de células dendríticas.

Después de seis días se lavaron las células, se re-suspendieron en medio con citocinas recientes y se cultivaron en presencia de células T de un donante diferente. Las células T se aislaron de PBMC con microperlas CD3+MACS (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las concentraciones de células dendríticas y células T en el ensayo de activación de células T eran 667.000 células /ml de cada tipo celular. Además, el co-cultivo contenía 150 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 y una dilución en serie de anticuerpos estimulantes desde 3,3 – 0,013 µg/ml. Los anticuerpos estimulantes eran B44, y ocho clones

A4, A5, B9, C4, F6, G12, H11 y H12. El co-cultivo se incubó a 37 °C durante 72 horas adicionales. Después, se analizaron los sobrenadantes en cuanto al contenido en IFN- γ por ELISA (Biolegends) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 **Tabla 6:** Aumento de la secreción de IFN- γ por anticuerpos anti-CD40 de la invención en comparación con el anticuerpo B44

Anticuerpo	CD Alo / T IFN- γ	
	CE50 μ g/ml	Máx (pg/ml)
B44	0,2	8,7
A4	0,04	8,9
A5	0,08	9,5
B9	0,03	8,5
C4	0,12	9
F6	0,15	9
G12	0,05	9,1
H11	0,03	9,5

Ejemplo 6 – Comparación de activación de células B por los anticuerpos anti-CD40 a modo de ejemplo

- 10 La unión de anticuerpos anti-CD40 agonistas al CD40 sobre las células B daba como resultado la activación y proliferación de células B, la agregación homeotípica y la regulación positiva de marcadores de superficie tales como CD23, CD30, CD80, CD86, Fas, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II y citocinas solubles, por ejemplo, IL-6, TNF- α y TNF- β (Schönbeck y Libby, 2001, Cell Mol Life 58(1), 4-43).
- 15 La medición de proliferación de células B inducidas por CD40 se utiliza comúnmente para evaluar los anticuerpos CD40 agonistas (Pound et al, 1999, Int Immunol, (11), 11-20).

Material y métodos

- 20 Se separaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la capa leucocitaria de sangre completa de la sangre completa por gradiente Ficoll y se aislaron las células B CD19+ con microperlas CD19+MACS (Miltenyi) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células CD19+ ($5-7,5 \times 10^4$ /pocillo), que alcanzaban ~95 % de pureza se cultivaron en medio RPMI + un 10 % de FCS + 10 ng/ml de IL4 y una dilución en serie de los anticuerpos. Después de 48-72 h, la actividad metabólica se midió con el Cell titer-Glo (Promega). Los valores de CE50 se calcularon utilizando el Graph Pad Prism.
- 25

Resultados

Tabla 7 – Activación de células B

Anticuerpo	CE50 (μ g/ml) +/- SEM
B44	0,204 +/- 0,025561
A5	0,29 +/- 0,0155
B9	0,48 +/- 0,0528
C4	0,288 +/- 0,06225
F6	0,40 +/- 0,04415
F9	0,21 +/- 0,0815
H11	0,46 +/- 0,0953
H12	0,18 +/- 0,003
G12	0,098 +/- 0,019657
A4	0,16 +/- 0,02395

Los anticuerpos anti-CD40 de la invención tienen potencia similar en la activación de las células B (es decir, del mismo orden de magnitud), que el B44 (véase la Tabla 7).

Ejemplo 7 – Capacidad de los anticuerpos anti-CD40 a modo de ejemplo de la invención para unirse a células RAMOS

La capacidad de los anticuerpos anti-CD40 de la invención para unirse a células RAMOS se determinó *in vitro*. Los inventores llevaron a cabo un análisis FACS de la unión de los anticuerpos anti-CD40 a la línea celular RAMOS del linfoma de Burkitt humano. Los valores de la CE50 se calcularon para los anticuerpos anti-CD40 de la invención y el anticuerpo B44 anti-CD40 original.

Materiales y métodos

La línea celular RAMOS de linfoma de Burkitt humano se utilizó para el análisis de unión (ECACC, Sigma Aldrich, USA). Los anticuerpos anti-CD40 sin conjugar de la invención se ensayaron en cuanto a su unión a las células RAMOS.

Las células RAMOS, aproximadamente 125.000 células, se incubaron con el anticuerpo anti-CD40, diluido en serie 1/3 desde 30-0,0015 µg/ml, durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y el anticuerpo secundario F(ab')₂/FITC (DAKO, Glostrup, Dinamarca) de conejo anti-Ig humana, se añadió posteriormente a las células durante otros 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron y analizaron en un instrumento FACScalibur, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Becton Dickinson, USA) y después se determinó la intensidad de fluorescencia media ("MFI").

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 8

Los clones de anticuerpo anti-CD40 tienen aproximadamente un aumento de la potencia de 100 veces en comparación con la del anticuerpo B44.

Tabla 8: Unión de los clones de anticuerpo a las células RAMOS

Anticuerpo anti-CD40	CE50 (µg/ml)
A4	7,0 x 10 ⁻³
A5	6,2 x 10 ⁻³
B9	4,9 x 10 ⁻³
C4	6,1 x 10 ⁻³
F6	5,8 x 10 ⁻³
G12	6,7 x 10 ⁻³
H11	4,4 x 10 ⁻³
H12	8,9 x 10 ⁻³
B44	0,38

Ejemplo 8 – Efecto de anticuerpos a modo de ejemplo *in vivo* en un modelo tumoral de ratón

Se estudió la actividad anti-tumoral de los anticuerpos anti-CD40 a modo de ejemplo de la invención en un modelo NSG de ratón en ausencia y presencia de células T y células dendríticas.

(A) Estudio utilizando tumores positivos a CD40 en ausencia de células T y células dendríticas

Materiales y métodos

Los inventores obtuvieron ratones NSG hembras (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm^{WJ}}/SzJ (NSG)) en Jackson, y se les permitió aclimatarse antes del tratamiento. Se inyectaron células de cáncer de vejiga (células EJ, 3 x 10⁶ células/ratón) por vía subcutánea. Se inyectó el G12 o el isotipo de control por vía intra-tumoral los días 0, 7 y 14 a una dosis de 1,2 mg/kg (30 µg). El volumen tumoral se midió los días 0, 7, 10, 14, 17, 21, 23 y 27. Los tumores se extirparon y pesaron el día 28.

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 6 y 7.

- 5 (B) Estudio utilizando tumores positivos a CD40 en presencia de células T y células dendríticas

Materiales y métodos

- 10 Los inventores obtuvieron ratones NSG hembras (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm^{Wjl}/SzJ} (NSG)) en Jackson, y se les permitió aclimatarse antes del tratamiento. Se inyectaron células de cáncer de vejiga (células EJ, $2,5 \times 10^6$ células/ratón) por vía subcutánea junto con CD (1×10^5) y células T (5×10^5) obtenidas del mismo donante. Las células dendríticas se prepararon a partir de los monocitos (como se ha descrito anteriormente. Cada grupo de tratamiento consistía en 10 ratones (n 10), en los que las células T y las CD de dos donantes se utilizaron en cinco ratones/donante (véase la Tabla 9).

15

Tabla 9

Sustancia de ensayo	Human moCD/células T (donante)	Número de ratones
PBS	Donante 1	5
	Donante 2	5
G12	Donante 1	5
	Donante 2	5

20

Se inyectó el G12, o PBS de control por vía intra-tumoral los días 0, 7 y 14 a una dosis de 1,2 mg/kg (30 ug). El volumen tumoral se midió los días 0, 7, 10, 14, 17, 21, 23 y 27. Los tumores se extirparon y se pesaron el día 28.

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 8 y 9.

Ejemplo 9 – Capacidad de rescatar células de la apoptosis

- La capacidad de los anticuerpos anti-CD40 para rescatar las células que expresaban el CD40 humano de la apoptosis y la detención del crecimiento se llevó a cabo *in vitro*. La apoptosis y detención del crecimiento se indujo en células WEHI-231 transfectadas mediante la adición de anticuerpos anti-IgM. Las células se rescataron mediante la adición de anticuerpos anti-CD40. Posteriormente a esto, se determinó la capacidad de las células para proliferar.

30

Se observó un aumento de la potencia, hasta de 40 veces, para los clones de anticuerpo anti-CD40 con respecto al anticuerpo B44 – véase la Tabla 9.

Materiales y métodos**Rescate de la apoptosis:**

- Una línea celular estable se transfectó con el CD40 humano, huCD40/WEHI-231, y se utilizó para investigar el rescate de apoptosis y detención del crecimiento (Ellmark et al., 2003, Immunology, 108, 452-7). Las células huCD40/WEHI-231, se cultivaron en placas de 96 pocillos (2×10^4 células/pocillo) en presencia o ausencia de anticuerpo anti-IgM de ratón, (Jackson Immunoresearch, USA), y un anticuerpo anti-CD40 de la invención, diluido en serie 1/3 desde 25-0,0001 µg/ml, durante 72 horas. Se añadió el Cell titer-Glo y la mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (Promega, USA). Las células se ensayaron en cuanto a la proliferación midiendo la liberación de ATP. Se midió la señal de luminiscencia en el FluoSTAR OPTIMA y se normalizó la señal (BMG, Alemania).

45

Tabla 10: Capacidad de los clones de anticuerpo para rescatar las células de la apoptosis y detención de crecimiento

Clon de anticuerpo anti-CD40	Veces de cambio en la potencia frente al anticuerpo B44
G12	19
A4	46
A5	19

B9	38
C4	52

Ejemplo 10: Resumen de la información de secuencias

Para cada anticuerpo descrito posteriormente, se muestran las posiciones de aminoácidos 1-112 de la V_L y posiciones de aminoácidos 1-119 de la V_H , junto con la correspondiente secuencia de nucleótidos. Las CDR están subrayadas en las secuencias de aminoácidos – en la secuencia de aminoácidos de la V_L , las CDR se encuentran en las posiciones de aminoácidos 23-40 (CDR1), posiciones 52-58 (CDR2) y 90-101 (CDR3); en la secuencia de aminoácidos de la V_H , las CDR se encuentran en las posiciones de aminoácidos 26-35 (CDR1), posiciones 42-67 (CDR2) y 97-108 (CDR3).

Anticuerpo B44

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) – SEQ ID NO: 58

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 59

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 60

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLLV
VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 61

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

Clon de anticuerpo A4

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) – SEQ ID NO: 19

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSTSNIGAGYKVYWYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 40

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

5 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 31

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLVT
VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 49

10

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCAACGTGAGCTCA

15

		<u>Secuencias de aminoácidos de CDR</u>
V _L CDR:	CDR1:	CTGSTSNIGAGYKVY [SEQ ID NO: 4]
	CDR2:	GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
	CDR3:	CAAWDDSLSGLV [SEQ ID NO: 12]
V _H CDR:	CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

20

Clon de anticuerpo A5

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 20

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYHVYWYQQLPGTAPKLLIYGSINRPSG
VPDRFSGSKSGTSGSLAISGLRSEDEADYYCAAWDSSSSGLVFGGGTKLTVLG

25

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 41

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 32

EVQLLES⁵GGGLVQPGGSLRLS¹⁰CAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR¹⁵AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGLVT
VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 50

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

15		<u>Secuencias de aminoácidos de CDR</u>
	V _L CDRs: CDR1:	CTGSSSNIGAGYH ⁵ VY [SEQ ID NO: 5]
		CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
		CDR3: CAAWDSSSSGLV [SEQ ID NO: 13]
	V _H CDRs: CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
20		CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
		CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

Clon de anticuerpo C4

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 21

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTG⁵STSNIGAGYKVY¹⁰WYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY¹⁵YCAAWDDSLSGLVF²⁰GGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 48

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCACCTCCAACATCGGGGCAGGTTACAAAGTATATTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 33

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADTVRGR~~FTISRDNSENALYLQMNSLR~~AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGT~~LV~~
VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 51

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACACAGTGAGGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGGGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

		<u>Secuencias de aminoácidos de CDR</u>
V _L CDRs:	CDR1:	CTGSTSNIGAGYKVY [SEQ ID NO: 4]
	CDR2:	GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
	CDR3:	CAAWDDSLSGLV [SEQ ID NO: 12]
V _H CDRs:	CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

Clon de anticuerpo G4

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 22

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS~~CTGSSSNIGAGYKVY~~WYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY~~CAAWDESITGLV~~FGGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 42

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 34

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRL~~SCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLRAEDTAVYYCCARILRGGSGMDLWGQGTLV
VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 52

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

		<u>Secuencias de aminoácidos de CDR</u>
V _L CDRs:	CDR1:	CTGSSSNIGAGYKVY [SEQ ID NO: 6]
	CDR2:	GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
	CDR3:	CAAWDESITGLV [SEQ ID NO: 14]
V _H CDRs:	CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

Clon de anticuerpo F6

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 23

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVYWYQQLPGTAPKLLIYRNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGSLLGLVFGGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 43

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATCGTAACATCAATCG

GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGGCAGCCTGCTGGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTG
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 35

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGT LVT

5 VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 53

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGTT
CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGTA
GTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAC
TCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG
TGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCCAA
GGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

10

		<u>Secuencias de aminoácidos de CDR</u>
V _L CDRs:	CDR1:	CTGSSSNIGAGYDVY [SEQ ID NO: 7]
	CDR2:	RNINRPS [SEQ ID NO: 11]
	CDR3:	CAAWDGSLLGLV [SEQ ID NO: 15]
V _H CDRs:	CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

15

Clon de anticuerpo F9

20

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 24

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYGVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGTLTGLLFGGGTKLTVLG

25

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 46

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGGTGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCTTCCC
TGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGGCACCCCTGACCGGTCTGCTGTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 36

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCCARILRGGSGMDLWGQGTLVTVSS

5 Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 54

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
 CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

		Secuencias de aminoácidos de CDR
10	V _L CDRs: CDR1:	CTGSSSNIGAGYGVY [SEQ ID NO: 8]
	CDR2:	GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
	CDR3:	CAAWDGTLTGLL [SEQ ID NO: 16]
	V _H CDRs: CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
15	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

Clon de anticuerpo G12

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 25

20 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYNVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
 VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 45

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
 CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCGGGTTACAATGTATACTGG
 TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
 GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
 CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
 GGATAAGAGCATTTCTGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTAG
 25 GT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 37

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNSENALYLQMNSLR AEDTAVYYCCARILRGGSGMDLWGQGTLVTVSS

30

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 55

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTAACTGGTCACCGTGAGCTCA

5		Secuencias de aminoácidos de CDR
	V _L CDRs: CDR1:	CTGSSSNIGAGYNVY [SEQ ID NO: 9]
		CDR2: GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
		CDR3: CAAWDKSISGLV [SEQ ID NO: 17]
	V _H CDRs: CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
10		CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
		CDR3: CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

Clon de anticuerpo H12

15 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 26

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYNVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGLVFGGGTKLTVLG

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 46

20 CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGACAGCCTGAGTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGTGAGTAGAACGTACGCTAGCAAGCTTGGATCCACGATCCTGAGCAAGGACCTCT
GCCCTCCCTGTTTCAAGCCCTTGCTTGCCTCAGCAGGTCATTACAACCACTTCACCTC
TGACCGCAGGGGCAGGGGACTAGATAGAATGACCTACTGAGCCTCGTCTGTCTGT
CTGTCTGTCTCTCTGTTTGTCTGTCTGTCTCTCTGTTTGTCTCTGTCTGTCTGACA
GGCGCAGGCTGGGTCTCTAAGCCTTGTTCTGTTCTGGCCTCCTCAGTCTGGGTTCT
TGTCGGAACAGCTTTGCCCTTGGGTTACCTGGGTTCCATCTCCTGGGGAATTGGGA
ACAAGGGGTCTGAGGGAGGCACCTCCTGGGAGACTTTAGAAGGACCCAGTGCCCT
CGGGGCTGATGCTCGGGA

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 38

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS**CAAS**GFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRRFTISRDNSENALYLQMNSLR**AEDTAVYY**CARILRGGSGMDLWGQGT**LV**
VSS

5 Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 56

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGGTGAGTCGTACGCTAGCAAGCTTTCTGGG
GCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAG
GTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCCAATGCCCATGAGCCCAGACACTGGACGCTGA
ACCTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGGCTCTGCGCCCTGGGCCCAGCTCTGTC
CCACACCGCGGTACATGGCACACCTCTCTTGACGCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA**ACTCAG**
GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCACGACT
CTA

		<u>Secuencias de aminoácidos de CDR</u>
10	V _L CDRs: CDR1:	CTGSSSNIGAGYNVY [SEQ ID NO: 9]
	CDR2:	GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
	CDR3:	CAAWDDSLSGLV [SEQ ID NO: 12]
	V _H CDRs: CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
15	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

Clones de anticuerpo B9 y H11

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 27

20 **QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**CTGSSSNIGAGYNVY**WYQQLPGTAPKLLIY**GNINRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGGLLGLV**FGGGTKLTVLG**

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) - SEQ ID NO: 47

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCA
CCATCTCTTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATAATGTATACTGG
TATCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACATCAATCG
GCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCC
CTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATG
GGATGGCGGCCTGCTGGGTCTGGTTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCCTA
GGT

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 39

EVQLLES~~GGGLVQPGGSLRLS~~CAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
FYADSVRGRFTISRDNS~~ENALYLQMNSLR~~AEDTAVYYCCARILRGGSGMDLWGQGT
LVT

5 VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 57

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAA
CTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGGTGAGTCGTACGCTAGCAAGCTTTCTGGG
GCAGGCCAGGCCTGACCTTGGCTTTGGGGCAGG

10

Secuencias de aminoácidos de CDR

V _L CDRs:	CDR1:	CTGSSSNIGAGYNVY [SEQ ID NO: 9]
	CDR2:	GNINRPS [SEQ ID NO: 10]
	CDR3:	CAAWDGGLGLV [SEQ ID NO: 18]
V _H CDRs:	CDR1:	GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]
	CDR2:	GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]
	CDR3:	CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30]

15

Regiones constantes de anticuerpos a modo de ejemplo de la invención

20

Región C de cadena pesada de Ig gamma-1 >sp|P01857|IGHG1_HUMAN OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[SEQ ID NO:62]

Región C2 de cadena ligera lambda de inmunoglobulina >gi|186127|gb|AAA59107.1| [Homo sapiens]

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSK
 QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS [SEQ ID NO:63]

5 **Mutaciones de regiones marco conservadas a modo de ejemplo en la región variable de cadena pesada (V_H)**

Las mutaciones se indican posteriormente en negrita subrayada.

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 64

10 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
 FYADSVRGRFTISRDNSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLVT
 VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 65

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
 15 CTCCGAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 66

20 EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYI
 FYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLVT
 VSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) - SEQ ID NO: 67

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTG
 AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTTTTCATATATTAGTGGTGGTAGT
 AGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAA
 CTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCC
 GTGTATTACTGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCC
 25 AAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCA

Tabla 11

Clon de anticuerpo con cambios de aminoácidos y posición en V _L con respecto al anticuerpo B44					
Clon de anticuerpo	Cambio de aminoácido	Cambio de aminoácido	Cambio de aminoácido	Cambio de aminoácido	Cambio de aminoácido
A4	S26T	D34K			
A5	D34H	N53S	A73G	D95S	L97S
G4	D34K	D95E	L97I	S98T	
F6	G52R	D95G	S98L		
F9	D34G	D95G	S96T	S98T	V101L
G12	D34N	D95K	L97I		
H12	D34N				
B9	D34N	D95G	S96G	S98L	
C4	S26T	D34K			
H11	D34N	D95G	S96G	S98L	

Tabla 12

Clon de anticuerpo con cambios de aminoácidos y posición en V _H con respecto al anticuerpo B44	
Clon de anticuerpo	Cambio de aminoácido
A4	
A5	
G4	
F6	
F9	
G12	
H12	
B9	
C4	S63T
H11	

5

Ejemplo 11: Formulaciones farmacéuticas a modo de ejemplo

Aunque es posible administrar solo un anticuerpo de la invención, es preferible presentarlo como un medicamento o formulación farmacéutica, junto con uno o más vehículos aceptables. Los vehículos deben ser “aceptables” en el sentido de que sean compatibles con el agente de la invención y no perjudiciales para los receptores del mismo. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógenos.

10

Los siguientes ejemplos ilustran medicamentos y composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en los que el principio activo es un anticuerpo de la invención.

15

Ejemplo A: Comprimido

Principio activo	1 mg
Lactosa	200 mg
Almidón	50 mg
Polivinilpirrolidona	5 mg
Estearato magnésico	4 mg

Los comprimidos se preparan con los ingredientes anteriores por granulación húmeda seguida por compresión.

Ejemplo B: Solución oftálmica

Principio activo	1 mg
Cloruro sódico, calidad analítica	0.9 g
Tiomersal	0.001 g
Agua purificada hasta	100 ml
pH ajustado a	7,5

5

Ejemplo C: Formulaciones en comprimidos

Las siguientes formulaciones A y B se preparaban por granulación húmeda de los ingredientes con una solución de povidona, seguido por la adición de estearato magnésico y compresión.

10

Formulación A

	mg/comprimido	mg/comprimido
(a) Principio activo	1	1
(b) Lactosa B.P.	210	26
(c) Povidona B.P.	15	9
(d) Glicolato sódico de almidón	20	12
(e) Estearato Magnésico	5	3
	251	51

Formulación B

	mg/comprimido	mg/comprimido
(a) Principio activo	1	1
(b) Lactosa	150	-
(c) Avicel PH 101®	60	26
(d) Povidona B.P.	15	9
(e) Glicolato sódico de almidón	20	12
(f) Estearato Magnésico	5	3
	251	51

Formulación C

	mg/comprimido
Principio activo	1
Lactosa	200
Almidón	50
Povidona	5
Estearato Magnésico	4
	260

Las siguientes formulaciones, D y E, se prepararon por compresión directa de los ingredientes mezclados. La lactosa que se utiliza en la formulación E es de la dirección del tipo de compresión.

15

Formulación D

	mg/cápsula
Principio activo	1
Almidón Pregelatinizado NF15	150
	151

Formulación E

	mg/cápsula
Principio activo	1
Lactosa	150
Avicel®	100
	251

Formulación F (Formulación de Liberación Controlada)

- 5 La formulación se preparó por granulación húmeda de los ingredientes (posteriormente) con una solución de povidona seguido por la adición de estearato magnésico y compresión.

	mg/comprimido
(a) Principio activo	1
(b) Hidroxipropilmetilcelulosa (Metocel K4M Premium)®	112
(c) Lactosa B.P.	53
(d) Povidona B.P.C.	28
(e) Estearato Magnésico	7
	201

La liberación del fármaco tiene lugar durante un periodo de 6-8 horas y era completa después de 12 horas.

10

Ejemplo D: Formulaciones en cápsula

Formulación A

- 15 Se preparó una formulación en cápsulas mezclando los ingredientes de la Formulación D del Ejemplo C anterior y cargándolos en una cápsula de gelatina dura de dos partes. La Formulación B (infra) se prepara de manera similar.

Formulación B

	mg/cápsula
(a) Principio activo	1
(b) Lactosa B.P.	143
(c) Glicolato sódico de almidón	25
(d) Estearato Magnésico	2
	171

Formulación C

	mg/cápsula
(a) Principio activo	1
(b) Macrogol 4000 BP	350
	351

- 20 Las cápsulas se prepararon mezclando el Macrogol 4000 BP, dispersando el principio activo en la mezcla y cargando la mezcla en una cápsula de gelatina dura de dos partes.

Formulación D

	mg/cápsula
Principio activo	1
Lecitina	100
Aceite de cacahuete	100
	201

- 25 Las cápsulas se preparan dispersando el principio activo en la lecitina y aceite de cacahuete y cargando la dispersión en cápsulas de gelatina blandas elásticas.

Formulación E (Cápsula de Liberación Controlada)

La siguiente formulación de una cápsula de liberación controlada se preparó extruyendo los ingredientes a, b y c utilizando un extrusor, seguido por esferización del extruido y secado. Los aglomerados secos se revistieron entonces con una membrana que controla la liberación (d) y se cargó en una cápsula de gelatina dura de dos piezas.

	mg/cápsula
(a) Principio activo	1
(b) Celulasa microcristalina	125
(c) Lactosa BP	125
(d) Etilcelulosa	13
	264

Ejemplo E: Formulación Inyectable

Principio activo 1 mg
Tampón fosfato estéril, libre de pirógenos (pH 7,0) hasta 10 ml

Los principios activos se disuelven en la mayoría del tampón de fosfato (35-40 °C), después se aumenta el volumen y se filtra a través de un filtro estéril de microporos en un vial de cristal ámbar de 10 ml (tipo 1) y se sella con tapones estériles y se sella encima.

Ejemplo F: Inyección intramuscular

Principio activo	1 mg
Alcohol bencílico	0,10 g
Glucófurol 75®	1,45 g
Agua para inyección q.s. hasta	3,00 ml

El principio activo se disuelve en glucófurol. Entonces se añade el alcohol bencílico y se disuelve, y se añade agua hasta los 3 ml. La mezcla se filtra entonces a través de un filtro de microporo estéril y se sella en viales de cristal de 3 ml estériles (tipo 1).

Ejemplo G: Suspensión de jarabe

Principio activo	1 mg
Solución de sorbitol	1,5000 g
Glicerol	2,0000 g
Celulosa dispersable	0,0750 g
Benzoato sódico	0,0050 g
Saborizante, melocotón 17.42.3169	0,0125 ml
Agua purificada q.s. hasta	5,0000 ml

El benzoato sódico se disuelve en una parte del agua purificada y se añade la solución de sorbitol. El principio activo se añade y se dispersa. En el glicerol se dispersa el espesante (celulosa dispersable). Las dos dispersiones se mezclan y se lleva al volumen necesario con agua purificada. Se consigue espesar adicionalmente si es necesario por cizallamiento extra de la suspensión.

Ejemplo H: Supositorio

	mg/supositorio
Principio activo (63 µm)*	1
Grasa dura, BP (Witepsol H15 - Dynamit Nobel)	1770
	1771

*El principio activo se utiliza como un polvo en el que al menos el 90 % de las partículas tienen un diámetro de 63

µm o menos.

Se mezcla una quinta parte del Witepsol H15 en una bandeja cubierta con vapor a 45 °C máximo. El principio activo se filtra a través de un tamiz de 200 µm y se añaden a la base fundida con mezclado, utilizando un silverson al que se ajusta una cabeza de corte hasta que se consigue una dispersión suave. Manteniendo la mezcla a 45 °C, se añadió el resto del Witepsol H15 a la suspensión y se agitó para asegurar una mezcla homogénea. La suspensión completa se pasó a través de una pantalla de acero inoxidable de 250 µm y, con agitado continuo se permitió que se enfriara a 40 °C. A la temperatura de 38 °C a 40 °C, 2,02 g de la mezcla se cargó en moldes de plástico adecuados. Se dejó que los supositorios se enfriaran a temperatura ambiente.

Ejemplo I: Pesarios

	mg/pesario
Principio activo	1
Dextrano anhidro	380
Almidón de patata	363
Estearato Magnésico	7
	751

Los ingredientes anteriores se mezclaron directamente y se prepararon los pesarios por compresión directa de la mezcla resultante.

Ejemplo 12: Efecto de anticuerpos a modo de ejemplo in vivo en modelo tumoral de ratón

La actividad anti-tumoral de un anticuerpo anti-CD40 de la invención se estudió en ratones transgénicos para el CD40 humano inoculados con células de cáncer de vejiga. Las células MB49 de cáncer de vejiga se inocularon por vía subcutánea a los ratones transgénicos para el CD40 humano. Los ratones se trataron por vía peri-tumoral el día 7 y 10 con G12 o controles. El tratamiento con G12 daba como resultado un efecto anti-tumoral significativo en comparación con el isotipo de control.

El anticuerpo de referencia S2C6 es un anticuerpo anti-CD40 quimérico compuesto de los dominios variables murinos, V_H y V_L, fusionados a las regiones constantes kappa y gamma 1 humanas respectivamente (Patente europea N° EP1885399, Francisco et al., 2000 Cancer Research). El anticuerpo es por tanto un análogo del anticuerpo anti-CD40 humanizado SGN-40 (Law et al., 2005 Cancer Research). El SGN-40 se ha estudiado en ensayos clínicos (Advani et al., 2009 J Clinical Oncology; Hussein et al., 2010 Haematologica).

Materiales y métodos

La línea celular MB49 es una células de carcinoma transicional inducidas por un carcinógeno derivadas de ratones C57BL/6 machos (Summerhayes y Franks, 1979, Journal of the National Cancer Institute). Las MB49 expresan CD40 murino pero no expresan CD40 humano. El G12 no tiene reacción cruzada con el CD40 murino y no se puede unir a las células tumorales MB49.

Se inocularon por vía subcutánea 2,5 x 10⁵ células MB49 de cáncer de vejiga en el flanco de ratones C57B76 hembras transgénicos al CD40 humano el día 0. Los ratones transgénicos al CD40 humano expresan el CD40 humano de tipo silvestre en un ratón con un entorno deficiente a CD40 (mCD40^{-/-}). El tratamiento comenzó el día 7 con anticuerpos inyectados por vía peri-tumoral en el tumor subcutáneo el día 7 y el día 10 (dos dosis). El volumen tumoral se midió 2 veces/semana con un calibre y se calculó por la fórmula del volumen de un elipsoide. Los ratones se sacrificaron si el tumor excedía 1 cm³ o si se desarrollaban úlceras. Se tomaron muestras de suero 4 h después de cada tratamiento. Los niveles citocinas en las muestras de suero se analizaron en el Kit Ultra-Sensible 7-Plex ProInflamatorio de ratón en una plataforma discovery Mesoscale (MSD, Gaithersburg, MD, USA). El título de anticuerpo se midió en el suero utilizando un ELISA sándwich. La línea celular MB49 es una célula de carcinoma transicional inducido por un carcinógeno derivado de ratones machos C57BU6 (Summerhayes y Franks, 1979, Journal of the National Cancer Institute). Las MB49 expresan CD40 murino pero no expresan CD40 humano. El G12 no tiene reactividad cruzada con el CD40 murino y no puede unirse a las células tumorales MB49.

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 10.

El tratamiento con G12 aumenta significativamente la supervivencia de los animales en comparación con el isotipo de control (p < 0,013). La curva de supervivencia de los ratones tratados con G12 en comparación con S2C6 (p < 0,13). La supervivencia de los ratones tratados con S2C6 en comparación con el isotipo de control (p < 0,088).

Ejemplo 13: Efecto de anticuerpos a modo de ejemplo in vivo en un modelo tumoral de ratón

La actividad anti-tumoral de los anticuerpos anti-CD40, interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y citocina derivada de queratinocitos (KC) (también conocida como ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C)/CXCL-1) se estudiaron utilizando los datos agrupados de un grupo mayor de animales tratados. El grupo de tratamiento con G12 contenía un grupo de 20 animales, el grupo de tratamiento con S2C6 contenía 12 animales, y el grupo del isótopo de control que contenía 20 animales.

Se inocularon células MB49 de cáncer de vejiga por vía subcutánea en ratones transgénicos al CD40 humano. Los ratones se trataron por vía peri-tumoral el día 7 y 10 con G12, o los controles. El tratamiento con G12 proporcionaba un aumento significativo de la supervivencia de los ratones que albergaban el tumor en comparación con el grupo tratado con el isotipo de control (Figura 11).

Se tomaron muestras de suero de los ratones tratados y se analizaron en cuanto a los niveles de citocinas. Los niveles de citocinas después del tratamiento demuestran una fuerte inducción de la respuesta inmunitaria de G12 en comparación con el anticuerpo de referencia, S2C6 (Figura 12).

Materiales y métodos

Se inocularon $2,5 \times 10^5$ células MB49 de cáncer de vejiga por vía subcutánea en el flanco de ratones C57BL/6 hembras transgénicos al CD40 humano el día 0. Los ratones transgénicos al CD40 humano expresan el tipo CD40 humano de tipo silvestre en un entorno de ratón deficiente a CD40 (mCD40-/-). El tratamiento comenzó el día 7 con los anticuerpos inyectados por vía peri-tumoral en el tumor subcutáneo el día 7 y el día 10 (dos dosis). El volumen tumoral se midió 2 veces /semana con un calibre y se calculó por la forma del volumen de un elipsoide. Los ratones se sacrificaron si el tumor excedía 1 cm^3 o si se desarrollaban úlceras. Las muestras de suero se tomaron 4 h después de cada tratamiento. Los niveles de citocinas en las muestras de suero se analizaron en un kit Ultra-Sensible ProInflamatorio 7-Plex utilizando la plataforma discovery Mesoscale (MSD, Gaithersburg, MD, USA). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, Inc. La Jolla, CA).

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 11 y 12.

Ejemplo 14: Análisis in vivo de niveles de anticuerpo

Los ratones tratados se analizaron en cuanto a niveles de anticuerpo en el suero. Se tomaron muestras de suero después del primer (día 7) y segundo (día 10) tratamiento. El título de anticuerpo era significativamente menor que el clon de anticuerpo anti-CD40 en comparación con los anticuerpos de referencia. Datos mostrados en la Figura 13.

Materiales y métodos

Las muestras de suero tomadas 4 h después del primer (día 7) y segundo (día 10) tratamiento del experimento descrito en el Ejemplo 1 se analizó en cuanto a niveles de anticuerpo. El título de anticuerpo se midió en el suero utilizando un ELISA sándwich.

El grupo de tratamiento de G12 consistía en 23 ratones (N = 23), el grupo de tratamiento de anticuerpo de referencia S2C6 consistía en 23 ratones (N = 23) y el grupo de tratamiento del isotipo de control consistía en 18 ratones (N = 18).

Resultados

Los resultados se muestran en la Figura 13.

Referencias

Advani et al., Phase I Study of the humanized anti-CD40 monoclonal antibody Dacetuzumab in refractory of recurrent non-hodgkin's lymphoma. J Clinical Oncology 27: 4371-4377 (2009)

Armitage et al., Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. Nature 357: 80-82 (1992).

Bajorath, J. Detailed comparison of two molecular models of the human CD40 ligand with an x-ray structure and critical assessment of model-based mutagenesis and residue mapping studies. J Biol Chem 273, 24603-9 (1998).

Bajorath, J. et al. Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. Biochemistry 34, 9884-92 (1995).

Bajorath, J. et al. Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry* 34, 1833-44 (1995).

Carter et al., *Nature Reviews Immunology* 6, 343-357 (2006).

Diehl, L. et al. CD40 activation *in vivo* overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat. Med.* 5, 774-779 (1999).

Ellmark et al., Identification of a Strongly Activating Human Anti-Cd40 Antibody that Suppresses HIV Type 1 Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24, 3, 367-373, (2008).

Ellmark et al., Modulation of the CD40-CD40L ligand interaction using human anti-CD40 single-chain antibody fragments obtained from the n-CoDeR® phage display library. *Immunology*, 106, 456-463.

Patente Europea nº EP1885399

Fellouse, F.A. et al. High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *J Mol Biol* 373, 924-940 (2007).

Francisco et al., Agonistic properties and *in vivo* antitumor activity of the anti-CD40 antibody SGN-14. *Cancer Research* 60, 3225-3231 (2000)

French, R.R., et al., CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nat Med* 5, 548-53 (1999).

Gatenby et al., Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature review Cancer* 4, 891-899 (2004).

Glaude et al., The CD40 agonist antibody CP-870,893 enhances dendritic cell and B-cell activity and promotes anti-tumor efficacy in SCID-hu mice. *Cancer Immunol Immunotherapy* 60(7): 1009-17 (2011).

Hussein et al., A phase I multi-dose study of dacetumumab (SGN-40, a humanized anti-CD40 monoclonal antibody) in patients with multiple myeloma. *Haematologica*, 95: 845-848 (2010)

Janeway's Immunobiology, 7ª edición, Garland Science (2008).

Kai et al., *Nature Biotechnology*, 26, 209-211 (2008).

Kalbasi, A. et al. CD40 expression by human melanocytic lesions and melanoma cell lines and direct CD40 targeting with the therapeutic anti-CD40 antibody CP-870,893. *J Immunother* 33, 810-816 (2010).

Katakura et al., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* (2008).

Koide, A., et al. Exploring the capacity of minimalist protein interfaces: interface energetics and affinity maturation to picomolar KD of a single-domain antibody with a flat paratope. *J Mol Biol* 373, 941-953 (2007).

Law et al., Preclinical antilymphoma activity of a humanized anti-CD40 monoclonal antibody, SGN-14 *Cancer Research* 65,18, 8331-8338 (2005)

Loskog, A.S. y Eliopoulos, A.G. The Janus faces of CD40 in cancer. *Semin. Immunol* 21, 301-307 (2009).

Quezada, S.A., Jarvinen, L.Z., Lind, E.F., y Noelle, R.J. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 22: 307-28., 307-328 (2004).

Schonbeck, U. y Libby, P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58, 4-43 (2001).

Siepmann et al., Rewiring CD40 is necessary for delivery of rescue signals to B cells in germinal centres and subsequent entry into the memory pool. *Immunology*, 102(3), 263-72 (2001).

Sklar et al., *Annual Review Biophysical Biomol Structure*, 31, 97-119, (2002).

Söderlind, E. et al. Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single-framework antibody libraries. *Nat Biotechnol* 18, 852-6 (2000)

Sotomayor, E.M. et al. Conversion of tumor-specific CD4+ T-cell tolerance to T-cell priming through *in vivo* ligation of CD40. *Nature Medicine* 5, 780-787 (1999).

Staveley-O'Carroll, K. et al. *In vivo* ligation of CD40 enhances priming against the endogenous tumor antigen and

promotes CD8+ T cell effector function in SV40 T antigen transgenic mice. J Immunol 171, 697-707 (2003).

Summerhayes y Franks, Journal of the National Cancer Institute 62: 1017-1023 (1979)

5 Tasci, I. et al., Soluble CD40 ligand levels in otherwise healthy subjects with impaired fasting glucose. Cell. Life. Sci. 58, 4-43 (2001).

10 Tong et al., CD40-directed gene therapy shows prospects for treating human cancers. Cancer Gene Therapy 10(1), 1-13 (2003)

Tutt et al., T cell immunity to lymphoma following treatment with anti-CD40 monoclonal antibody. J Immunol 168 (6) 2720-8, (2002).

15 van Kooten ,C. y Banchereau, J. CD40-CD40 ligand. J Leukoc Biol 67, 2-17 (2000).

van Mierlo,G.J. et al. CD40 stimulation leads to effective therapy of CD40(-) tumors through induction of strong systemic cytotoxic T lymphocyte immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 5561-5566 (2002).

20 White et al., Interaction with FcγRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody Journal of Immunology (187), 1754-1763, (2011).

Wilson et al., Cancer Cell (19), 101-113, (2011).

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo con especificidad de unión multivalente por el CD40,

5 en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

CTGSX₁SNIGX₂VY [SEQ ID NO: 1]

10 en la que:

X₁ es S o T; y

X₂ es K o H o D o G o N

15 en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

X₃NINRPS [SEQ ID NO: 2]

20 en la que:

X₃ es G o R

25 en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena ligera variable (V_L) en la que la CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos:

CAAWDX₄X₅X₆X₇GLX₈ [SEQ ID NO: 3]

en la que:

30

X₄ es D o S o E o G o K; y

X₅ es S o T o G; y

X₆ es L o S o T o L o I; y

X₇ es S o T o L; y

35

X₈ es V o L

en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena pesada variable (V_H) en la que la CDR1 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

40 GFTFSTYGMH [SEQ ID NO: 28]

en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena pesada variable (V_H) en la que la CDR2 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

45 GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR [SEQ ID NO: 29]

en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden una cadena pesada variable (V_H) en la que la CDR3 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

50 CARILRGGSGMDL [SEQ ID NO: 30].

55 en donde la potencia del anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno para la activación de células dendríticas es mayor que, o es igual a, su potencia para la activación de células B y en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno tiene una afinidad (KD) para CD40 de menos de 1×10^{-10} M en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo son capaces de unirse al dominio 1 de CD40 y en donde la afinidad (KD) por CD40 se mide por resonancia de plasmones superficiales.

60 2. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la Reivindicación 1 en donde el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno tienen una potencia mayor para la activación de células dendríticas que el anticuerpo B44 que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera variable de SEQ ID NO: 58 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada variable de SEQ ID NO: 60.

65 3. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con las Reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento comprenden las siguientes CDR:

(i) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID

- NO: 30; o
(ii) SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
(iii) SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
5 (iv) SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
(v) SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
10 (vi) SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
(vii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
15 (viii) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30; o
(ix) SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30.
4. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que
20 comprende una región Fc de anticuerpo de un anticuerpo IgG1.
5. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la Reivindicación 4 en el que la región Fc
comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62.
- 25 6. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación anterior que
comprende un resto citotóxico.
7. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con la Reivindicación 6 en el que el resto citotóxico
es capaz de convertir un profármaco no citotóxico en un fármaco citotóxico o en el que el resto citotóxico es un
30 radio-sensibilizante.
8. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno como se define
en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7.
- 35 9. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en la Reivindicación 8.
10. Una célula huésped recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en la
Reivindicación 8 o un vector como se define en la Reivindicación 9.
- 40 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo o de un fragmento de unión
al antígeno como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, y un tampón, un excipiente, un diluyente o
un vehículo farmacéuticamente aceptables, opcionalmente en donde la composición farmacéutica es adecuada para
la administración parenteral y/o la administración local en o cerca del sitio de un tumor.
- 45 12. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, o
una molécula de ácido nucleico como se define en la Reivindicación 8, o un vector como se define en la
Reivindicación 9, o una célula huésped como se define en la Reivindicación 10, o una composición farmacéutica
como se define en la Reivindicación 11, para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 50 13. Un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno o una molécula de ácido nucleico o un vector o una célula
huésped o una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la Reivindicación 12, en donde el cáncer se
selecciona de entre el grupo que consiste en: cáncer de próstata, cáncer de mama; cáncer colorrectal; cáncer
pancreático; cáncer ovárico; cáncer de pulmón; cáncer de cuello uterino; rhabdomyosarcoma; neuroblastoma;
mieloma múltiple; leucemia; leucemia linfoblástica aguda; melanoma; cáncer de vejiga y glioblastoma.
- 55

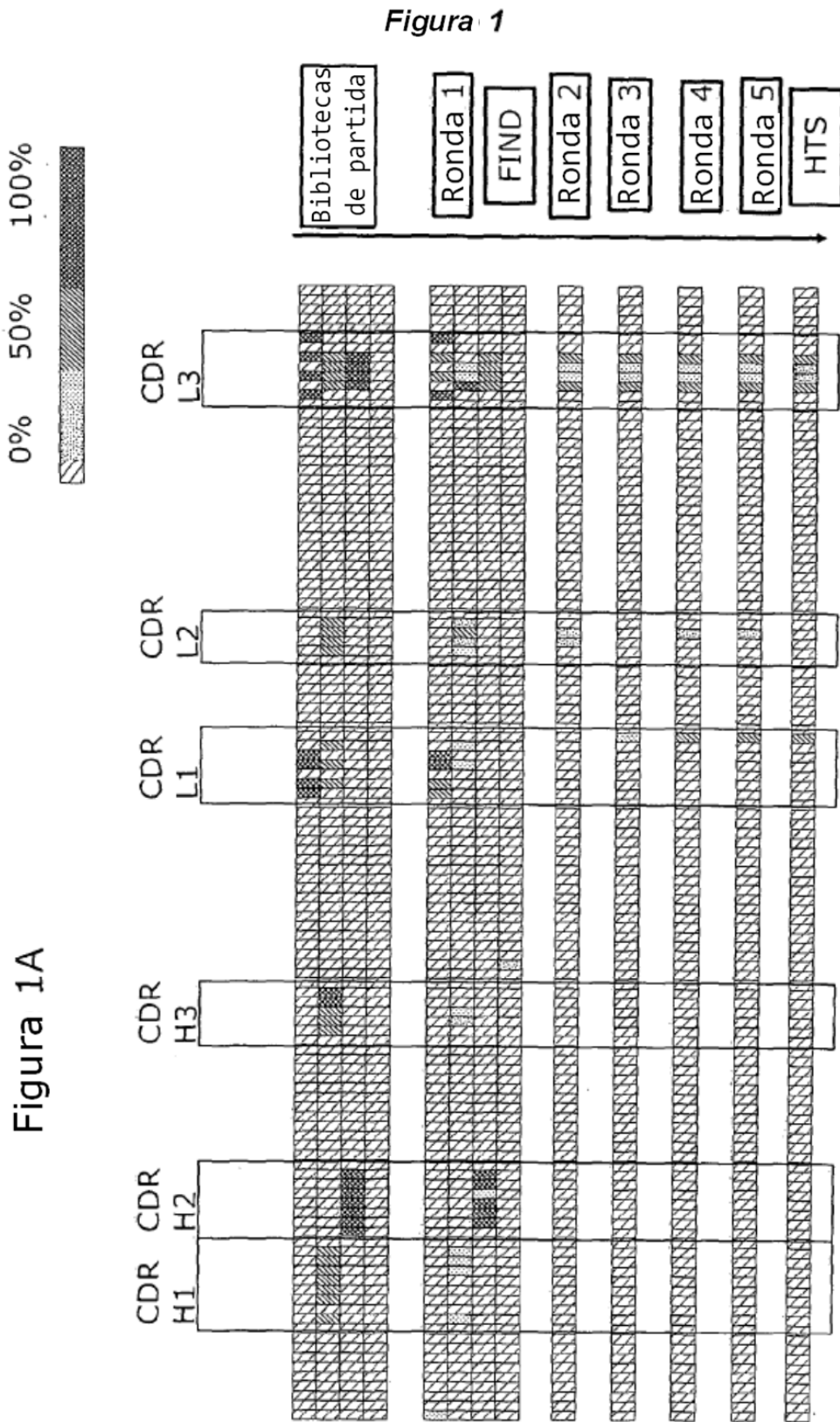


Figura 1 (continuación)



Figura 1B

Figura 2

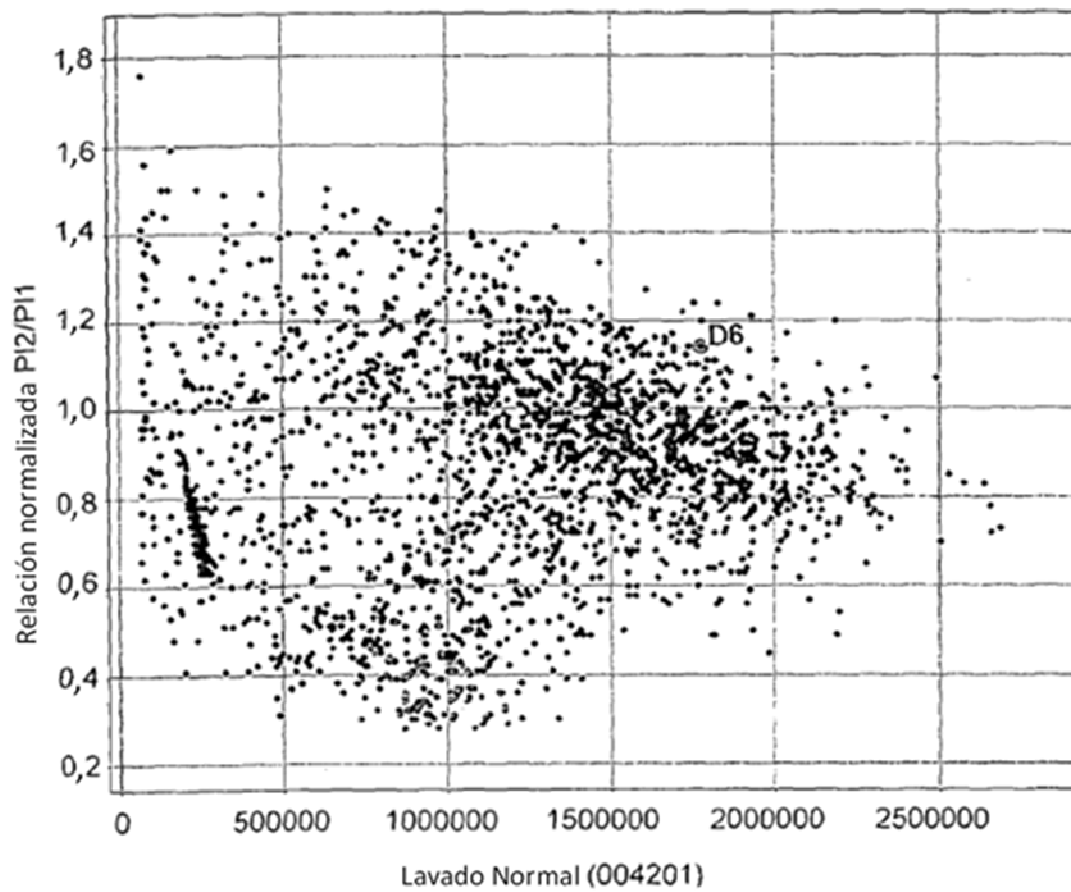


Figura 3

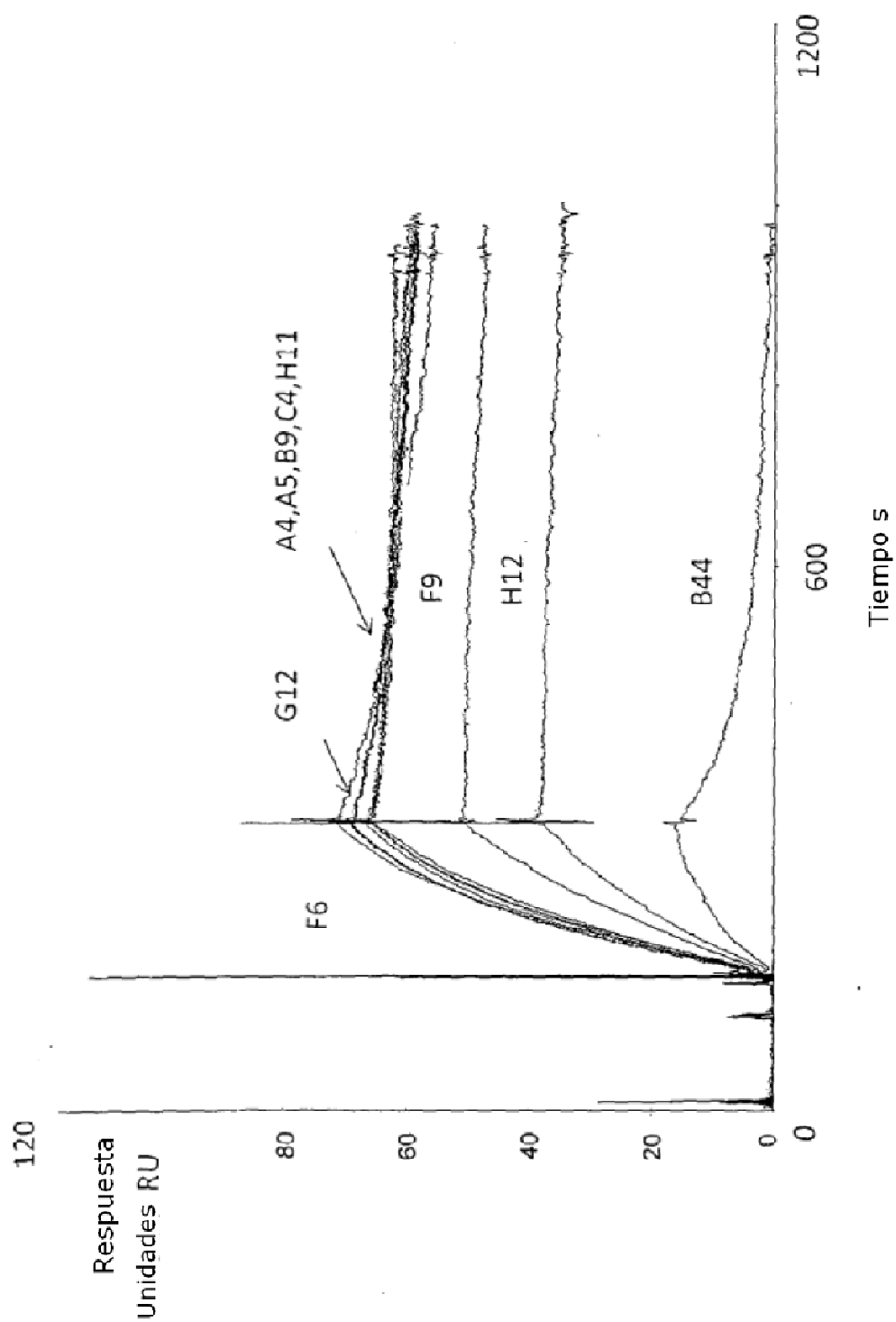


Figura 4

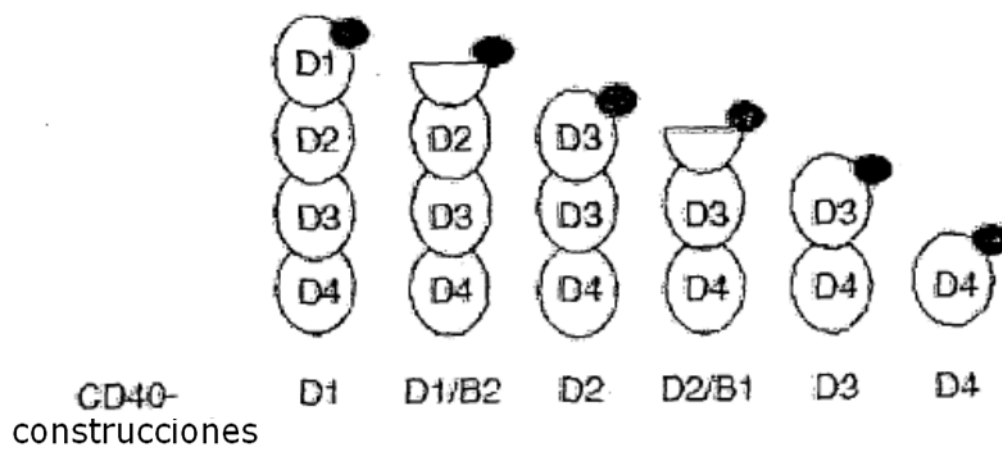


Figura 5

A

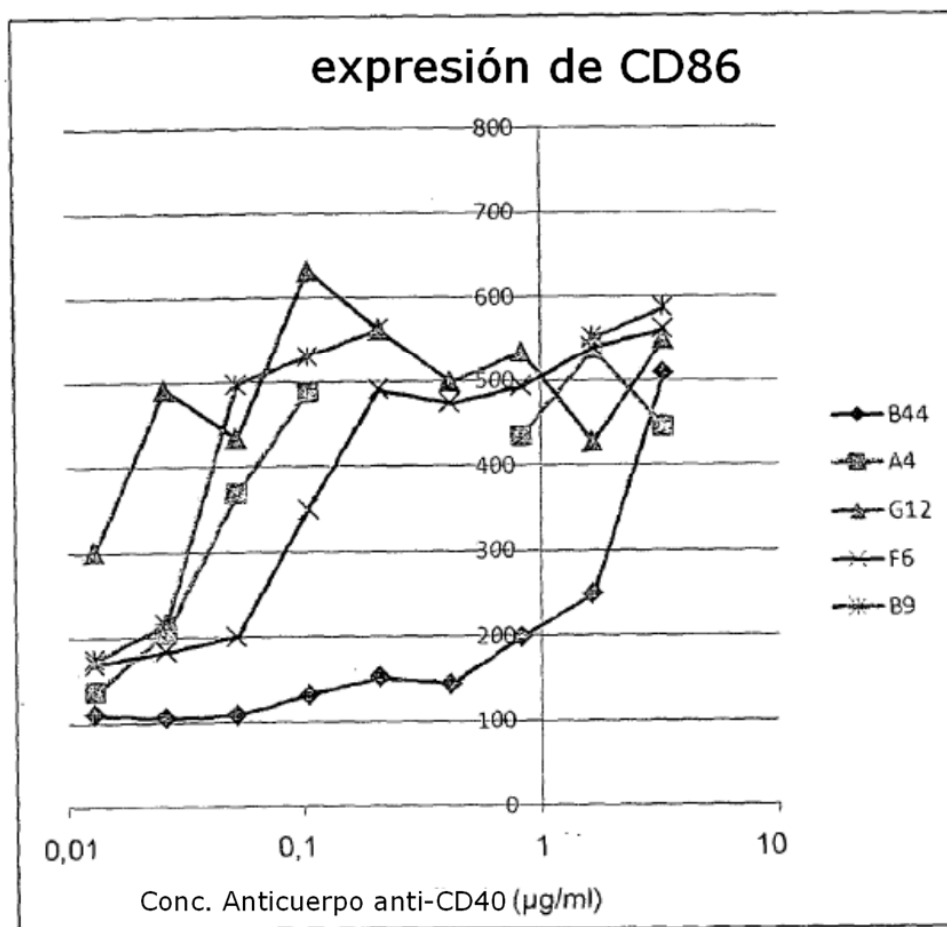


Figura 5 (continuación)

B

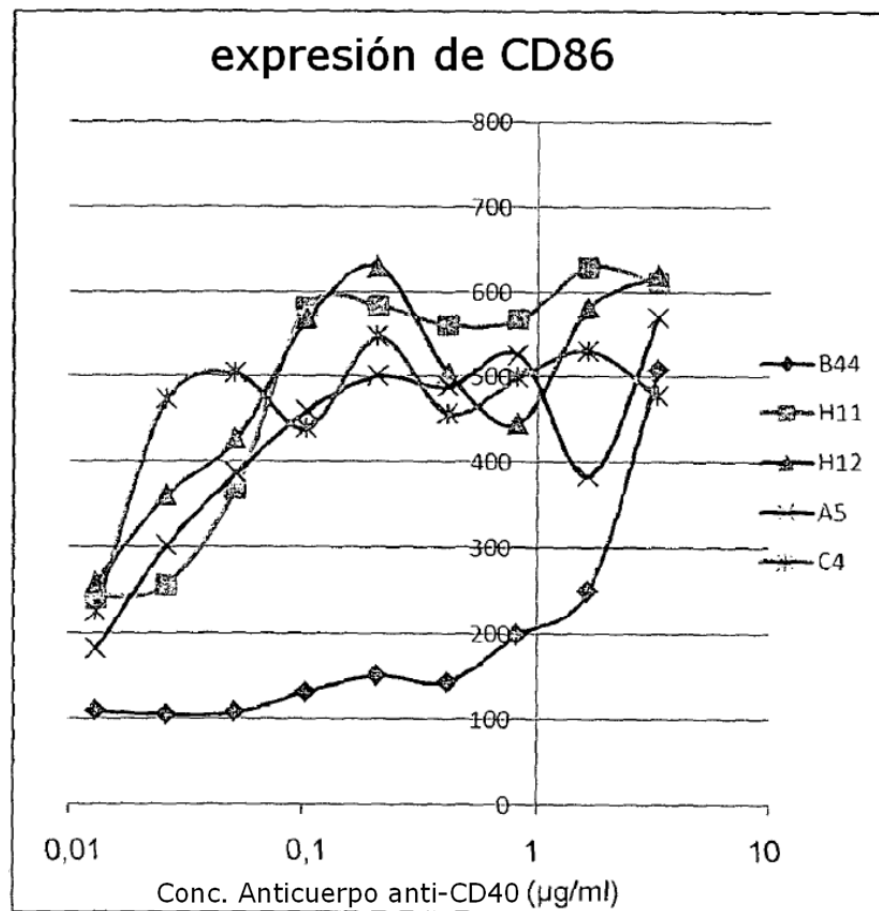


Figura 6

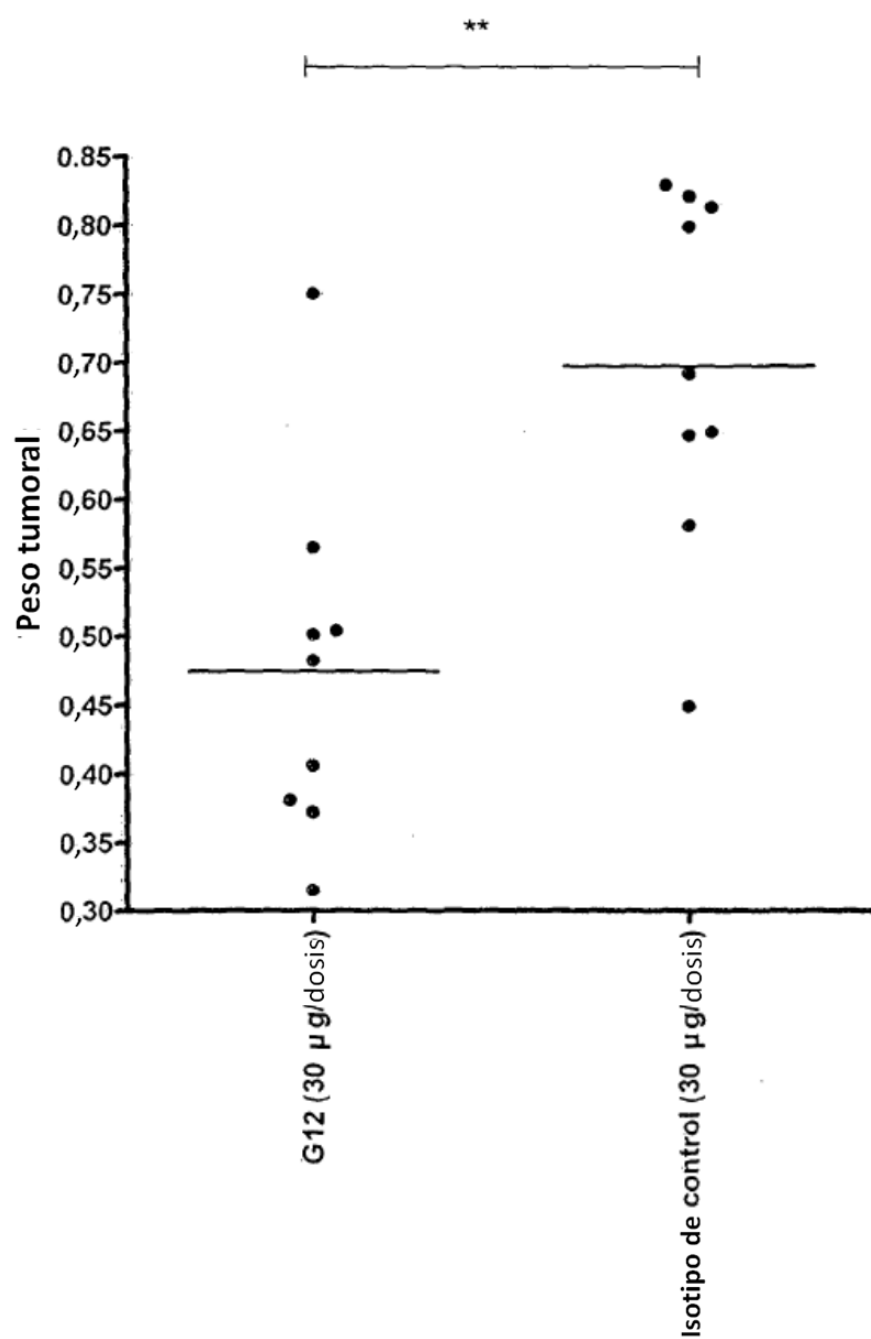


Figura 7

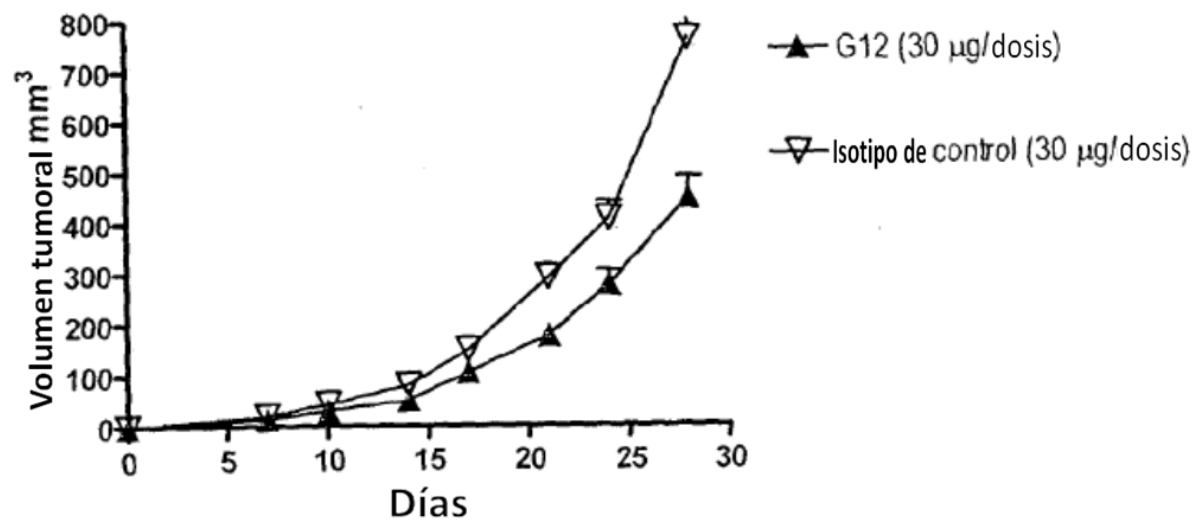


Figura 8

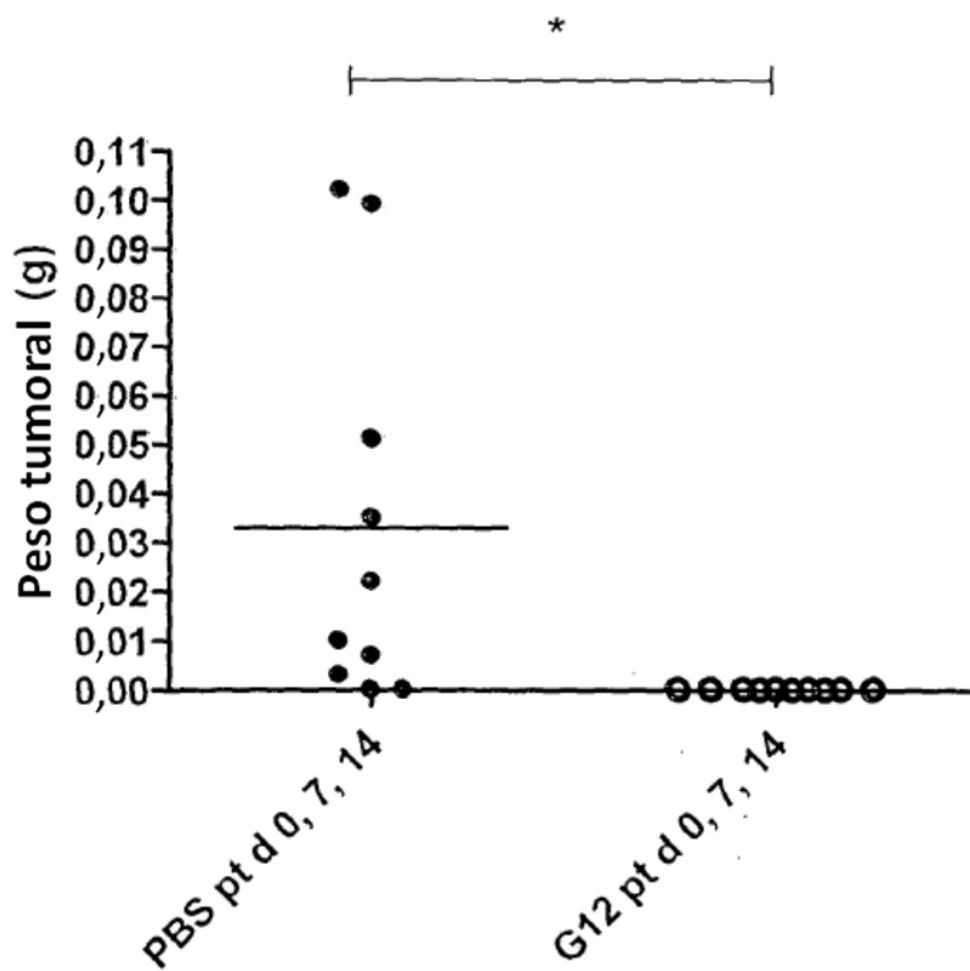


Figura 9

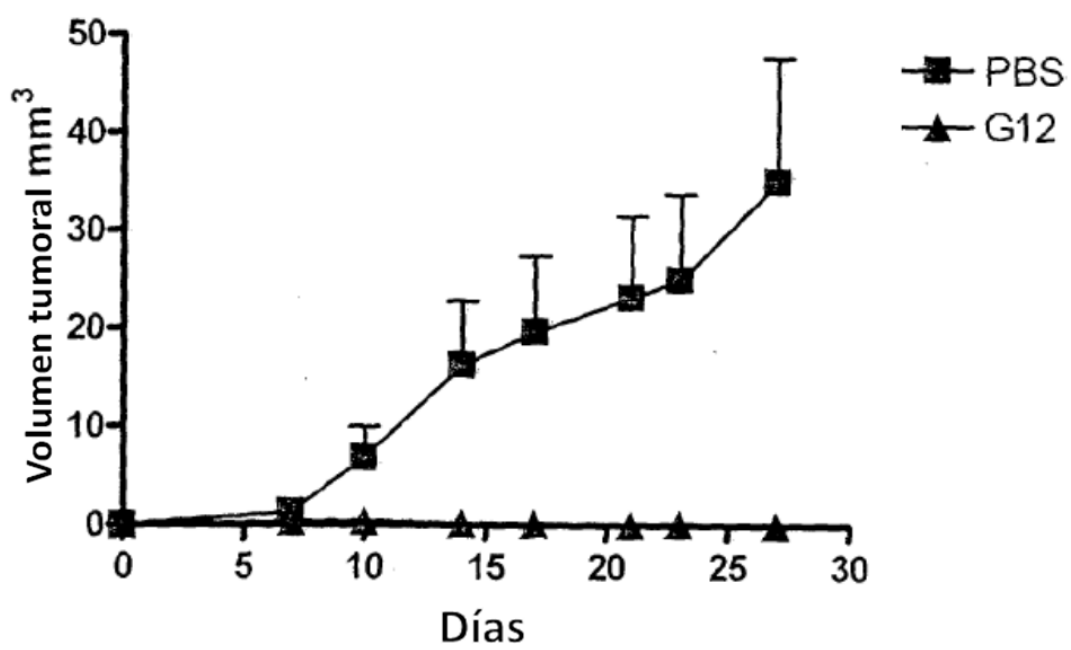


Figura 10

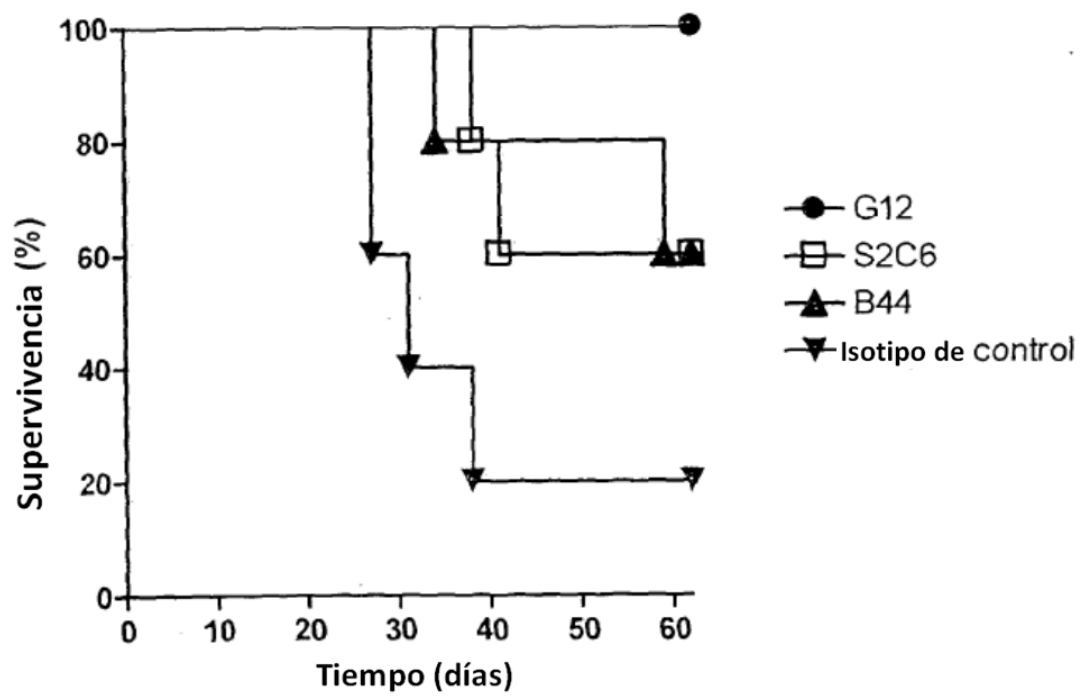


Figura 11

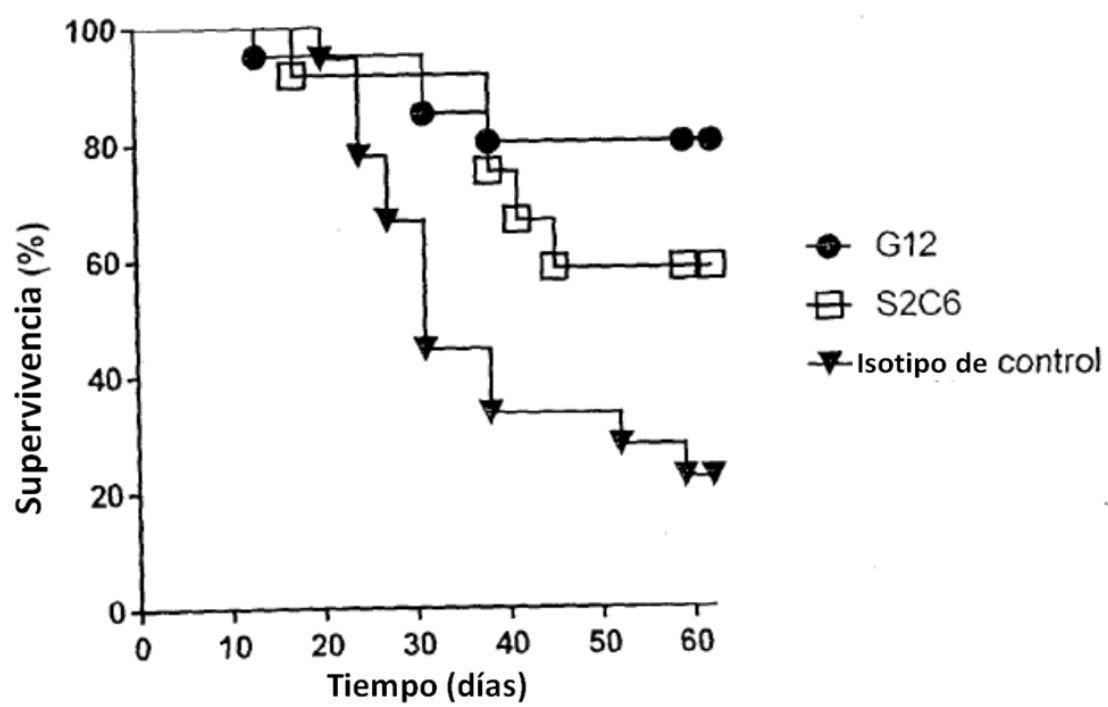


Figura 12

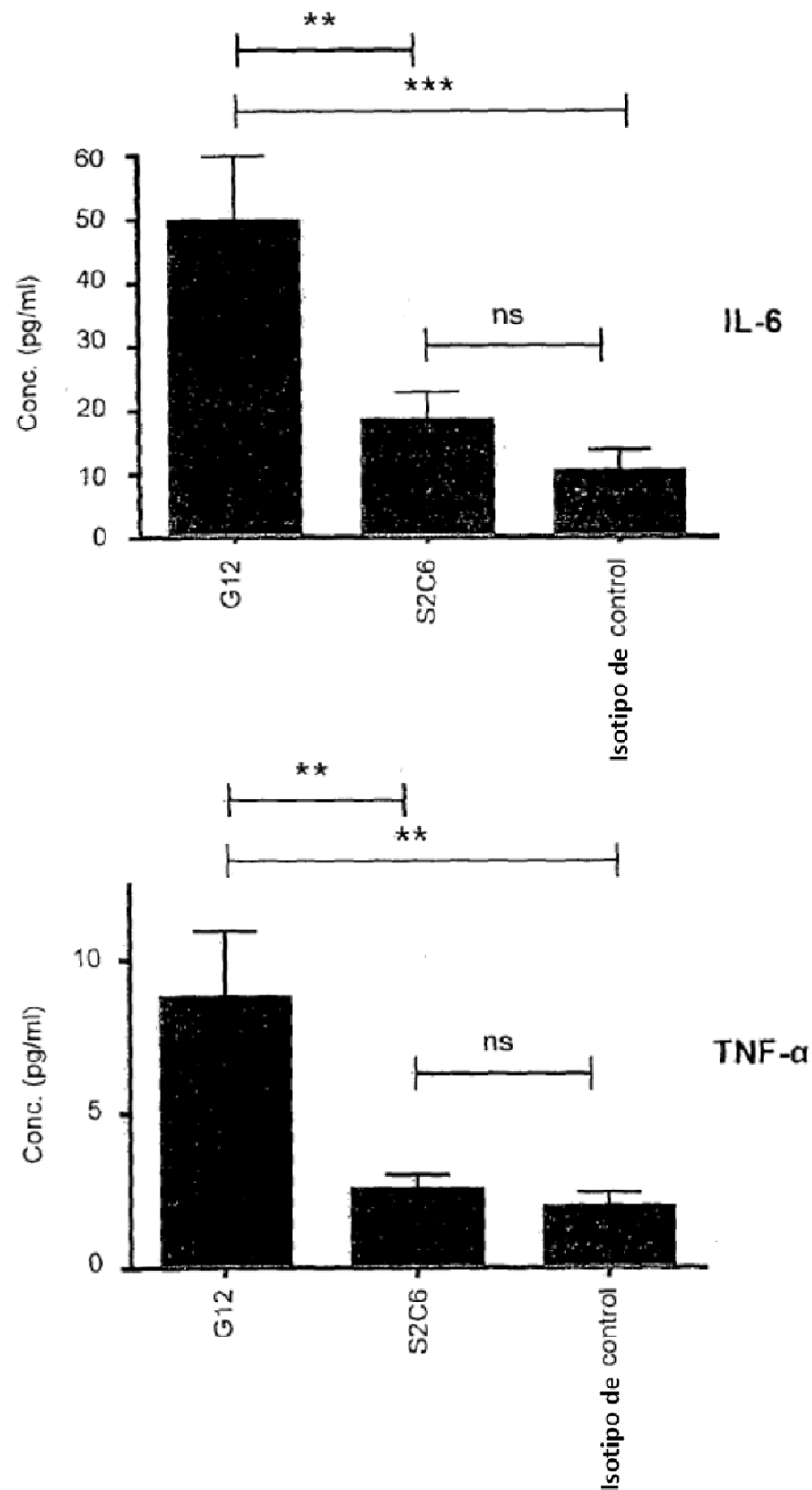


Figura 12 (continuación)

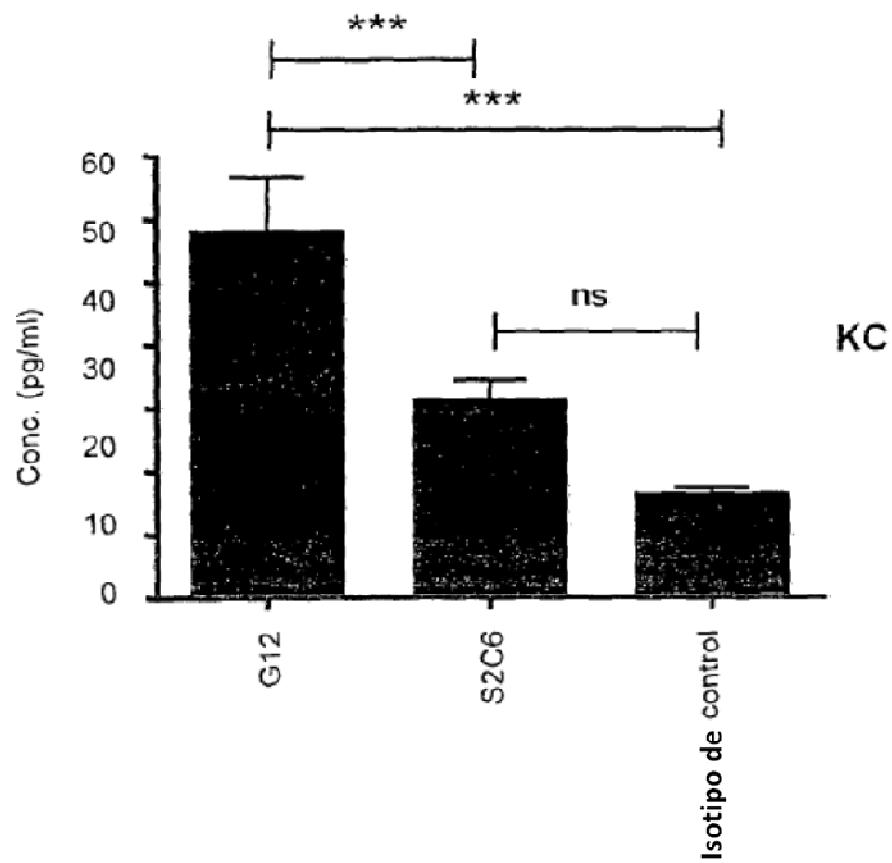


Figura 13

