

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 463**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2015 PCT/EP2015/068598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16023960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2015 E 15750051 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 3180087**

54 Título: **Tratamientos combinados con anticuerpos anti-CD40**

30 Prioridad:

12.08.2014 GB 201414270

18.12.2014 GB 201422614

01.05.2015 GB 201507541

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

24.09.2019

73 Titular/es:

ALLIGATOR BIOSCIENCE AB (100.0%)

Medicon Village

223 81 Lund, SE

72 Inventor/es:

ELLMARK, PETER;

NORLEN, PER y

VEITONMÄKI, NIINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 725 463 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

Tratamientos combinados con anticuerpos anti-CD40

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a tratamientos combinados para tratar un tumor sólido en un sujeto, así como a usos de los mismos. Los tratamientos combinados comprenden (a) un anticuerpo, o el fragmento de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 y (b) un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1.

Antecedentes de la invención

El cáncer es la principal causa de muertes prematuras en el mundo desarrollado. El objetivo de la inmunoterapia en el cáncer es aumentar una respuesta inmunitaria eficaz del cuerpo contra un tumor, en particular, un tumor sólido. Esto se puede lograr mediante, por ejemplo, la ruptura de la tolerancia al antígeno tumoral, el aumento de las respuestas inmunitarias antitumorales y la estimulación de respuestas de citocina locales en el sitio tumoral. La célula efectora clave de una respuesta inmunitaria antitumoral de larga duración es el linfocito T efector específico de tumor activado. La activación incompleta de linfocitos T efectores mediante, por ejemplo, células dendríticas puede producir la anergia de linfocitos T, lo que produce una respuesta antitumoral ineficaz, mientras que la inducción adecuada mediante células dendríticas puede generar una expansión potente de linfocitos T efectores activados, lo que redirige la respuesta inmunitaria hacia el tumor.

La molécula del receptor de CD40 de la superficie celular es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y es un regulador clave en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Se expresa en células presentadoras de antígenos humanas, en particular, linfocitos B, células dendríticas y macrófagos, así como en células normales, tales como fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliales y células epiteliales. Además, se expresa en un amplio rango de células tumorales, que incluyen todos los linfomas B, 30 – 70 % de tumores sólidos, melanomas y carcinomas.

El ligando natural de CD40, designado como CD154 o CD40L, se expresa principalmente en linfocitos T maduros. La señalización mediada por CD40L desencadena varios eventos biológicos, que incluyen la activación de células inmunitarias, la proliferación y la producción de citocinas y quimiocinas. Por ende, la estimulación mediante el receptor de CD40 mejora las funciones celulares e inmunitarias. Su función en las respuestas inmunitarias mediadas por células es conocida. Por ejemplo, la activación de células dendríticas mediante estimulación de CD40 induce la activación de linfocitos T efectores. Por lo tanto, el tratamiento con agonistas de CD40 puede proporcionar el medio para redirigir la respuesta inmunitaria y expandir los linfocitos T efectores dirigidos hacia el tumor.

Se han informado los efectos antitumorales de algunos anticuerpos anti-CD40, en donde se identificaron varios mecanismos. Se observa un efecto indirecto para tumores que no expresan CD40, que incluye la activación de células presentadoras de antígenos, en particular, mayor actividad de los linfocitos T citotóxicos específicos de tumor y de las células *natural killer* (células NK). Se observan mecanismos antitumorales tanto indirectos como directos en los tumores que expresan CD40, en donde el anticuerpo contra CD40 que se fija a las células tumorales induce la apoptosis celular. Estos mecanismos para la actividad antitumoral se pueden complementar mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC). Sin embargo, la administración de anticuerpos anti-CD40 también estuvo asociada a los efectos secundarios adversos, tales como síndrome de liberación de citocina.

En consecuencia, aún existe la necesidad de mejorar los tratamientos del cáncer, en particular, anticuerpos anti-CD40 adecuados para usar en el tratamiento de tumores sólidos y tratamientos combinados de aquellos.

Síntesis de la invención

La invención se define en las reivindicaciones en el presente documento.

Un primer aspecto de la invención proporciona un kit de tratamiento combinado para tratar un tumor sólido en un sujeto, que comprende (a) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40, y (b) un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, en donde el agente no es un anticuerpo anti-CD40 ni el fragmento de fijación al antígeno de este, en donde el anticuerpo o la porción de fijación al antígeno de este que se fija específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|---|----------------|
| V _L CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY | [SEQIDNO:1]; |
| V _L CDR2: GNINRPS | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: CAAWDKISISGLV | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDR1: GFTFSTYGMH | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR | [SEQIDNO:5]; y |
| V _H CDR3: CARILRGGSGMDL | [SEQ ID NO:6]; |

y en donde el agente inmunoterapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1.

5 En una forma de realización, el tumor sólido se selecciona de los grupos que consisten en un adenoma, un blastoma, un carcinoma, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un tumor de células germinales, un linfoma, un sarcoma, un tumor de Wilms, un tumor pulmonar, un tumor de colon, un tumor linfático, un tumor mamario y un melanoma. Por ejemplo, el tumor sólido puede ser un melanoma, tal como un melanoma metastásico.

10 En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende o consiste en un anticuerpo intacto.

15 En una forma de realización alternativa, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende o consiste en un fragmento de fijación al antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento Fv (tal como un fragmento Fv monocatenario, o un fragmento Fv unido a disulfuro) y un fragmento tipo Fab (tal como un fragmento Fab; un fragmento Fab' o un fragmento F(ab)₂).

En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, es humano o humanizado.

20 En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y/o la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8.

25 En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y/o la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 12.

30 Por ende, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende o consiste en la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 más SEQ ID NO:11 y/o la cadena pesada de SEQ ID NO: 8 más SEQ ID NO:12.

Los kits de tratamientos combinados de la invención comprenden adicionalmente un anticuerpo anti-PD1, o el fragmento de fijación al antígeno de este, capaz de inhibir la función de PD1 (por ejemplo, Nivolumab, Pembrolizumab, Lambrolizumab, Pidilizumab y AMP-224).

35 Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que la presencia de dos agentes activos (como se detalla anteriormente) puede proporcionar un beneficio sinérgico en el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto. El término "sinérgico" significa que el efecto terapéutico de los dos agentes combinados (por ejemplo, como se determina en referencia a la tasa de crecimiento o al tamaño del tumor) es mayor que el efecto terapéutico adicional de los dos agentes administrados solos. Tal sinergia se puede identificar evaluando los agentes activos, solos y combinados, en un modelo de línea celular relevante del tumor sólido.

De manera opcional, el kit de tratamiento combinado también comprende un tercer agente inmunoterapéutico con eficacia en el tratamiento del cáncer.

45 Por ejemplo, el tratamiento combinado puede comprender (a) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40, (b) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a PD1 o PD-L1, y (c) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CTLA-4.

50 Un segundo aspecto de la invención proporciona un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 para usar en un método para tratar un tumor sólido, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|---|----------------|
| V _L CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY | [SEQIDNO:1]; |
| V _L CDR2: GNINRPS | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: CAAWDKSI SGLV | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDRI: GFTFSTYGMH | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR | [SEQIDNO:5]; y |
| V _H CDR3: CARILRGGSGMDL | [SEQ ID NO:6], |

55 y en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 se usa en combinación con un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, en donde el agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1.

60 En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 es como se analizó anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

En una forma de realización, el agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer es como se analizó anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

- 5 Un tercer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40, y (b) un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|--|----------------|
| V _L CDR1: <u>CTGSSSNIGAGYNVY</u> | [SEQIDNO:1]; |
| V _L CDR2: <u>GNINRPS</u> | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: <u>CAAWDKSISGLV</u> | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDRI: <u>GFTFSTYGMH</u> | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: <u>GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR</u> | [SEQIDNO:5]; y |
| V _H CDR3: <u>CARILRGGSGMDL</u> | [SEQ ID NO:6]. |

10

En una forma de realización, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 es como se analizó anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

- 15 En una forma de realización, el agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer es como se analizó anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

- 20 También se describe en el presente documento un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, en donde el método comprende (a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40, y (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, en donde el agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1, en donde el anticuerpo o la porción de fijación al antígeno de este que se fija específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|--|----------------|
| V _L CDR1: <u>CTGSSSNIGAGYNVY</u> | [SEQIDNO:1]; |
| V _L CDR2: <u>GNINRPS</u> | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: <u>CAAWDKSISGLV</u> | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDRI: <u>GFTFSTYGMH</u> | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: <u>GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR</u> | [SEQIDNO:5]; y |
| V _H CDR3: <u>CARILRGGSGMDL</u> | [SEQ ID NO:6]. |

25

El anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 puede ser como se analizó anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

- 30 El agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer puede ser como se analizó anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

- 35 En el método de tratamiento anterior, las etapas (a) y (b) se llevan a cabo de manera simultánea, o la etapa (b) se lleva a cabo entre 24 horas y dos semanas después de la etapa (a), entre 24 horas y una semana después de la etapa (a), entre 24 y 72 horas después de la etapa (a), o entre 24 y 48 horas después de la etapa (a).

Opcionalmente, la etapa (a) comprende la administración local del anticuerpo en el sitio tumoral.

- 40 Opcionalmente, al menos 30 % de la cantidad de anticuerpo administrado en la etapa (a) se retiene en el sitio tumoral 4 horas después de la administración, preferentemente, en donde al menos 40 % de dicha cantidad se retiene en el sitio tumoral 4 horas después de la administración.

Opcionalmente, el agente terapéutico adicional de la etapa (b) se formula como una composición adecuada para la administración sistémica con al menos un diluyente o un portador aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

- 45 Opcionalmente, la etapa (a) se lleva a cabo en múltiples ocasiones separadas, y la etapa (b) se lleva a cabo de modo tal que la exposición del sujeto al agente terapéutico adicional sea continua en la duración del método.

Opcionalmente, el sujeto es un ser humano.

- 50 Los inventores también mostraron de manera sorprendente que determinados anticuerpos anti-CD40 se retienen en el sitio de un tumor sólido después de la administración a un sujeto. Por ende, solo una proporción pequeña del anticuerpo escapa del sitio tumoral hacia la circulación vascular o linfática del sujeto.

Esto genera un tratamiento altamente eficaz, así como efectos secundarios reducidos, lo que permite una dosis

menor de anticuerpo que se debe usar. Estas ventajas son particularmente evidentes cuando tal anticuerpo se administra localmente en un sitio tumoral en un sujeto, pero también puede ser evidente cuando el anticuerpo se administra de manera sistémica.

- 5 Sin embargo, las personas del oficio de nivel medio comprenderán que el anticuerpo anti-CD40 también se puede administrar al sujeto de manera sistémica, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea.

Los inventores también mostraron de manera sorprendente que combinar la administración de un anticuerpo anti-CD40 que se retiene en el sitio tumoral con la administración sistémica a un sujeto de un agente terapéutico adicional produce una mejora en el efecto del tratamiento, con respecto a la administración del anticuerpo anti-CD40 solo.

10 Por lo tanto, también se describe en el presente documento un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, en donde el método comprende (a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se fija específicamente a CD40 y que se retiene en el sitio tumoral después de la administración y, opcionalmente, (b) administrar de manera sistémica al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1. Las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera simultánea. De manera alternativa, las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera secuencial siempre que la etapa (a) anteceda a la etapa (b). En la etapa (a), el anticuerpo anti-CD40 se administra preferentemente de manera local en el tumor.

15 Por lo tanto, la invención proporciona un kit para tratar un tumor sólido en un sujeto, en donde el kit comprende (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se fija específicamente a CD40 y que se retiene en el sitio tumoral después de la administración y, opcionalmente, (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional que es adecuado para la administración sistémica a un sujeto cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1. El anticuerpo que se fija específicamente a CD40 se proporciona preferentemente en una forma adecuada para la administración local en un tumor.

20 **Breve descripción del listado de secuencias**

SEQ ID NO: 1, 2 y 3 son CDR 1, 2 y 3, respectivamente, de la cadena ligera del anticuerpo G12 (definido de acuerdo con la numeración IMGT).

35 SEQ ID NO: 4, 5 y 6 son CDR 1, 2 y 3, respectivamente, de la cadena pesada del anticuerpo G12 (definido de acuerdo con la numeración IMGT).

SEQ ID NO: 7 y 8 son las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada, respectivamente, del anticuerpo G12.

SEQ ID NO: 9 y 10 son las secuencias de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera y de la región variable de la cadena pesada, respectivamente, del anticuerpo G12.

40 SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena ligera de ejemplo.

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de una región constante de la cadena pesada de ejemplo.

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de CD40 humana.

45 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 muestra el nivel de anticuerpo detectable en suero de ratones hCD40tg que tienen un tumor de células de cáncer de vejiga que no expresan hCD40, MB49, después de la administración de un anticuerpo por vía intratumoral (IT), peritumoral (PT) o intravenosa (IV) en una dosis de 100 µg.

50 La Figura 2 muestra el nivel de anticuerpo detectable en muestras de sangre de *Macaca fascicularis* después de la administración del anticuerpo en las dosis indicadas por vía subcutánea o intravenosa.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis citométrico de flujo de la expresión de CD40 humana de la superficie celular mediante (A) células B16.F10(hCD40+) clon 5.G12.46 y (B) células transfectadas simuladas.

55 La Figura 4A muestra tasas de supervivencia de ratones hCD40tg que tienen melanoma B16.F10(hCD40+) subcutáneo después del tratamiento con control, ADC-1013 solo o ADC-1013 con un anticuerpo anti-PD-1 ("PD-1").

La Figura 4B muestra volumen tumoral para cada grupo de tratamiento el día que se sacrificó el primer ratón. Los gráficos muestran datos agrupados de dos experimentos individuales (n=16). La eficacia antitumoral significativa y la supervivencia aumentada se demostraron con tratamiento con ADC-1013. La eficacia antitumoral mejorada y la supervivencia mejorada se observaron con tratamiento combinado con anti-PD-1 (* = p < 0,05, ** = < 0,01, prueba de rango logarítmico para supervivencia y prueba Mann-Whitney para volumen tumoral).

60 La Figura 5A muestra los resultados de un ensayo para la activación de células que expresan CD11c en el drenaje de ganglios linfáticos después de diferentes modos de administración de un anticuerpo anti-CD40 en un modelo de tumor de ratón. Administración intratumoral (IT), administración intraperitoneal (IP). La activación se indica mediante el nivel de expresión de CD86, medido mediante la media de intensidad de fluorescencia (MFI).

65 La Figura 5B muestra los resultados de un ensayo para la activación de células que expresan CD11b en el drenaje de ganglios linfáticos después de diferentes modos de administración de un anticuerpo anti-CD40 en un

modelo de tumor de ratón. Administración intratumoral (IT), administración intraperitoneal (IP). La activación se indica mediante el nivel de expresión de CD86, medido mediante la media de intensidad de fluorescencia (MFI).

Figura 6. Los tumores B16.F10.hCD40+ se inocularon en un flaqueo. Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Se administró ADC-1013 por vía intratumoral (100 µg por dosis). Se inyectaron por vía intraperitoneal anticuerpo anti-PD-1, 250 µg por dosis (Clon RPM1-14, BioXcell) y anticuerpo anti-CTLA-4, 100 µg por dosis (9D9, BioXcel). Se muestra el volumen tumoral el día 14.

Figura 7. Los tumores B16.F10 se inocularon en un flaqueo. Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Los anticuerpos ADC-1013, anti-CD137 (Lob 12.3) y anti-OX40 (CD86) y los controles se administraron por vía intratumoral (100 µg por dosis). Se realizó un seguimiento del volumen tumoral con el tiempo.

Figura 8. El efecto antitumoral de ADC-1013 en el tumor B16.F10.hCD40+ en comparación con el efecto antitumoral en tumores B16.F10 (de tipo silvestre, wt, por sus siglas en inglés) después del tratamiento con ADC-1013 o control (intratumoral, 100 µg los días 3, 6 y 9).

Figura 9. Se administró ADC-1013 (30 µg) por vía intratumoral los días 10, 13, 16 en ratones hCD40tg-BalbC (F1) con tumores de linfoma establecidos (A20). El volumen tumoral y la supervivencia con el tiempo se presentan en la figura.

Figura 10. Se administró ADC-1013 (100 µg) por vía intratumoral los días 4, 7 y 10 en ratones hCD40tg con tumores establecidos (LLC-1). El volumen tumoral se presenta en la figura.

Figura 11. Efecto antitumoral en el modelo de metástasis del cáncer tipo melanoma B16.F10. Los ratones hCD40tg con un tumor en cada flanco recibieron 100 µg de ADC-1013 por vía peritumoral en el tumor en el flanco derecho, los días 3, 6 y 9 después de la inoculación del tumor. En la figura se muestra el volumen tumoral con el tiempo para el tumor inyectado (tumor derecho) y el tumor no inyectado (izquierdo).

Figura 12. Volumen tumoral el día 16. Se administró ADC-1013 por vía intravenosa los días 3, 6 y 9 en ratones hCD40tg con tumores de melanoma establecidos (B16.F10.hCD40+), 100ug (n=12).

La Figura 13 muestra un efecto antitumoral (medido mediante la supervivencia con el tiempo) en tumores de linfoma A20 subcutáneos en ratones BalbC. Los ratones se trataron con 9D9 (anticuerpo anti-CTLA-4, BioXcel) por vía peritumoral los días 5 y 8, y con el agonista de TLR, CpG (1668) por vía intratumoral los días 5, 8 y 11.

Descripción detallada de la invención

Cabe destacar que las diferentes aplicaciones de los tratamientos combinados y los métodos divulgados se pueden personalizar a las necesidades específicas en el estado de la técnica. Asimismo, cabe destacar que la terminología que se usa en la presente tiene como finalidad describir solamente formas de realización particulares de la invención y no pretende limitarlas.

Además, como se usan en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia al plural, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Por ende, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye "anticuerpo", la referencia a "un antígeno" incluye dos o más de tales antígenos, la referencia a "un sujeto" incluye dos o más de tales sujetos, y similares.

Un "polipéptido" se usa en la presente en el sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos de la subunidad, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos. Por ejemplo, el término "polipéptido" incluye secuencias de péptidos cortos y también proteínas y polipéptidos más largos. Como se usa en la presente, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y los isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos.

"Se retiene en el sitio de un tumor sólido" significa que el anticuerpo anti-CD40 se libera solo lentamente del área tumoral. La retención del anticuerpo en el sitio tumoral se puede evaluar mediante el monitoreo de niveles en suero del anticuerpo después de la administración (véase Mangsbo *et al.*, 2014, *Clin. Cancer Res.* 21(5):1115-1126). Por ejemplo, en una forma de realización, los niveles en suero de anti-CD40 cuatro horas después de la inyección intratumoral de 30 µg del anticuerpo (en 60 µl) son menores de 1 µl/ml.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia significa que se administra una sustancia determinada a un sujeto que tiene una afección, en una cantidad suficiente para curar, aliviar o interrumpir parcialmente la afección o uno o más de sus síntomas. Este tratamiento terapéutico puede producir una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad o un aumento en la frecuencia o la duración de los períodos sin síntomas. Las cantidades eficaces para un fin determinado y un agente determinado dependerán de la gravedad de la enfermedad o lesión así como del peso y el estado general del sujeto. Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier mamífero, preferentemente, un ser humano.

Métodos

En el presente documento se describe un método para tratar un tumor sólido en un sujeto. El tumor es generalmente maligno y puede ser metastásico.

Los tumores sólidos se definen generalmente según el tejido en el que se originan, por ejemplo, mama, colon, etc. Sin embargo, debido a que la inmunoterapia actúa en el sistema inmunitario, y no en el tumor en sí mismo, el estado

inmunitario del tumor puede ser más predictivo de la respuesta que del origen del tumor. En los estudios complementarios presentados en la presente, dos modelos diferentes con mayor detalle, un modelo de melanoma, B16.F10 (con o sin CD40 humana) y el modelo de tumor de vejiga MB49. Los datos presentados en los ejemplos más adelante muestran que MB49 es más inmunógeno que B16.F10. Sin embargo, en ambos modelos, se observa un efecto antitumoral significativo después del tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 como se describe en la presente. Por ende, la invención proporciona un efecto antitumoral en tumores inmunógenos (tales como MB49) y en modelos poco inmunógenos (tales como B16.F10).

Por ende, el tumor puede ser inmunógeno. Tales tumores se caracterizan por la infiltración de células inmunitarias, tales como linfocitos T y células de origen mieloide. Se demostró que la infiltración de linfocitos T CD8, es decir, un perfil tumoral más inmunógeno, se correlaciona con un buen pronóstico después del tratamiento, por ejemplo, en cáncer de colon, (Galon *et al.*, 2014, *J. Pathol.* 232(2):199-209).

Como alternativa, el tumor puede ser no inmunógeno o poco inmunógeno. Los tumores poco inmunógenos a menudo tienen poca o ninguna expresión de MHC1 y se caracterizan por una menor cantidad de células inmunitarias infiltrantes, tales como linfocitos T y células de origen mieloide (Lechner *et al.*, 2013, *J Immunotherapy* 36(9):477-89). El tumor puede ser un adenoma, un adenocarcinoma, un blastoma, un carcinoma, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un tumor de células germinales, un linfoma, un sarcoma, un tumor de Wilms, un tumor pulmonar, un tumor de colon, un tumor linfático, un tumor mamario o un melanoma.

Los tipos de blastoma incluyen hepatoblastoma, glioblastoma, neuroblastoma o retinoblastoma. Los tipos de carcinoma incluyen carcinoma colorrectal o carcinoma hepatocelular, carcinomas de páncreas, de próstata, gástricos, de esófago, de cuello uterino, y de cabeza y cuello, y adenocarcinoma. Los tipos de sarcoma incluye sarcoma de Ewing, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma o cualquier otro sarcoma de tejidos blandos. Los tipos de melanoma incluyen lentigo maligno, melanoma lentigo maligno, melanoma extensivo superficial, melanoma acrolentiginoso, melanoma mucoso, melanoma ganglionar, melanoma polipoide, melanoma desmoplásico, melanoma amelanótico, melanoma de tejidos blandos, melanoma con células pequeñas tipo nevo, melanoma con características de un nevo de Spitz y melanoma maligno uveal. Los tipos de linfoma incluyen leucemia/linfoma de linfocitos T precursores, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de células del manto, leucemia/linfoma linfocítico crónico de linfocitos B, linfoma MALT, linfoma de Burkitt, micosis fungoide, linfoma de linfocitos T periférico, forma de esclerosis ganglionar de linfoma de Hodgkin, subtipo de celularidad mixta de linfoma de Hodgkin. Los tipos de tumores pulmonares incluyen tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas (adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes) y carcinoma pulmonar de células pequeñas.

Existe una incidencia creciente de melanoma y, aproximadamente, 200.000 nuevos casos son diagnosticados a nivel mundial cada año. Además, el melanoma es muy apto para administración local en la clínica, ya que los tumores primarios así como las metástasis a menudo son fácilmente accesibles. Por ende, el tumor es preferentemente un melanoma, y con mayor preferencia, es un melanoma metastásico. El tumor se puede clasificar como metastásico debido a un resultado alto de la prueba de lactato deshidrogenasa. El tumor se pudo haber clasificado como cualquiera de los siguientes estadios, pero es preferentemente el estadio III o IV.

Estadio 0: Melanoma *in situ* (Nivel de Clark I), 99,9 % de supervivencia

Estadio I / II: Melanoma invasivo, 89–95 % de supervivencia

T1a: Menos de 1,0 mm de espesor del tumor primario, sin ulceración, y mitosis < 1/mm²
 T1b: Menos de 1,0 mm de espesor del tumor primario, con ulceración o mitosis ≥ 1/mm²
 T2a: 1,01–2,0 mm de espesor del tumor primario, sin ulceración

Estadio II: Melanoma de alto riesgo, 45–79 % de supervivencia

T2b: 1,01–2,0 mm de espesor del tumor primario, con ulceración
 T3a: 2,01–4,0 mm de espesor del tumor primario, sin ulceración
 T3b: 2,01–4,0 mm de espesor del tumor primario, con ulceración
 T4a: Mayor de 4,0 mm de espesor del tumor primario, sin ulceración
 T4b: Mayor de 4,0 mm de espesor del tumor primario, con ulceración

Estadio III: Metástasis regional, 24–70 % de supervivencia

N1: Ganglio linfático positivo único
 N2: Dos o tres ganglios linfáticos positivos o metástasis cutánea regional/en tránsito
 N3: Cuatro ganglios linfáticos positivos o un ganglio linfático y metástasis cutánea regional/en tránsito

Estadio IV: Metástasis distantes, 7–19 % de supervivencia

M1a: Metástasis cutánea distante, LDH normal

M1b: Metástasis pulmonar, LDH normal

5 M1c: Otra metástasis distante o cualquier metástasis distante con LDH elevada

El método comprende (a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se fija específicamente a CD40 y que se retiene en el sitio tumoral después de la administración, y opcionalmente, (b) administrar de manera sistémica al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional, cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1. La retención de un anticuerpo en un sitio tumoral se describe con mayor detalle más adelante. Las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera simultánea. De manera alternativa, las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera secuencial siempre que la etapa (a) anteceda a la etapa (b). En la etapa (a), el anticuerpo anti-CD40 se administra preferentemente de manera local en el tumor.

El método tiene varias desventajas. En primer lugar, debido a que el anticuerpo anti-CD40 se retiene en el sitio tumoral, es altamente eficaz como un tratamiento. Además, existe una exposición sistémica reducida a anticuerpos anti-CD40, lo que permite usar una dosis menor de anticuerpo y produce menos efectos secundarios. Cuando se lleva a cabo la etapa (b), el efecto del tratamiento se mejora adicionalmente.

La invención proporciona:

- un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se fija específicamente a CD40 y que se retiene en el sitio tumoral después de la administración para usar en un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, en donde el método comprende (a) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de tal anticuerpo que se fija específicamente a CD40, y opcionalmente, (b) administrar de manera sistémica al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional, cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1. Las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera simultánea. De manera alternativa, las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera secuencial siempre que la etapa (a) anteceda a la etapa (b). En la etapa (a), tal anticuerpo anti-CD40 se administra preferentemente de manera local en el tumor.
- un producto que contiene (1) un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se fija específicamente a CD40 y que se retiene en el sitio tumoral después de la administración y opcionalmente (2) un agente terapéutico adicional para uso simultáneo, por separado o secuencial en un método para tratar un tumor sólido en un sujeto, cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1, en donde el método comprende (a) administrar de manera local al tumor una cantidad terapéuticamente eficaz de tal anticuerpo que se fija específicamente a CD40, y opcionalmente (b) administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional. Las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera simultánea. De manera alternativa, las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera secuencial siempre que la etapa (a) anteceda a la etapa (b). En la etapa (a), tal anticuerpo anti-CD40 se administra preferentemente de manera local al tumor.

Tiempo y orden de las etapas (a) y (b)

Las etapas (a) y (b) se llevan a cabo preferentemente de manera secuencial (es decir, en diferentes momentos), en donde la etapa (a) se lleva a cabo antes de la etapa (b).

Las etapas (a) y (b) se separan preferentemente mediante un intervalo de modo que se optimice el efecto antitumoral combinado. En general, esto significa que la etapa (b) se realiza durante un intervalo lo suficientemente extenso después de la etapa (a) que al menos un efecto fisiológico de la etapa (a) se encuentra en su nivel más alto o cerca de este. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 estimulará, en general, las células dendríticas que, a su vez, producen la activación de los linfocitos T específicos del tumor. Los linfocitos T activados comienzan a expresar niveles más altos de las moléculas de los puntos de control del sistema inmunitario (tales como PD-1) dentro de alrededor de 24 horas de tratamiento con anti-CD40. Estas moléculas de los puntos de control del sistema inmunitario pueden regular de manera negativa la respuesta antitumoral. Por ende, el agente administrado en la etapa (b) puede ser preferentemente un agente (tal como un anticuerpo anti-PD1 o anti-PDL1) que bloquea o inhibe la actividad de tal punto de control del sistema inmunitario. Cuando el agente administrado en la etapa (b) es un agente como tal, la etapa (b) se lleva a cabo preferentemente durante un intervalo lo suficientemente extenso después de la etapa (a) de modo que el nivel de expresión de la molécula de los puntos de control del sistema inmunitario en células en el sujeto, o la cantidad de células en el sujeto que expresa tal molécula de los puntos de control del sistema inmunitario, sean elevados con respecto al nivel o la cantidad en el sujeto antes de la etapa (a), o con respecto al nivel o la cantidad en un sujeto saludable. En este contexto, la etapa (b) se lleva a cabo preferentemente entre 24 horas y dos semanas después de la etapa (a), entre 24 horas y una semana después de la etapa (a), entre 24 horas y 72 horas después de la etapa (a), o entre 24 horas y 48 horas después de la etapa (a).

De manera alternativa, la etapa (b) se puede llevar a cabo preferentemente en un punto temporal después de la

etapa (a) donde se determine que el nivel de expresión de la molécula de los puntos de control del sistema inmunitario en células en el sujeto, o la cantidad de células en el sujeto que expresa tal molécula de los puntos de control del sistema inmunitario, son elevados con respecto al nivel o la cantidad en el sujeto antes de la etapa (a), o con respecto al nivel o la cantidad en un sujeto saludable.

5 El nivel de expresión de una molécula de puntos de control del sistema inmunitario en una célula de un sujeto, o la cantidad de células en un sujeto que expresan tal molécula, se pueden determinar a través de cualquier medio adecuado, por ejemplo, mediante análisis citométrico de flujo de una muestra extraída del sujeto.

10 De manera alternativa, puede ser preferible llevar a cabo las etapas (a) y (b) de manera simultánea (es decir, al mismo tiempo), o con 24 horas de diferencia entre ellas, de modo que ambas etapas se puedan llevar a cabo el mismo día o durante la misma visita a un centro de tratamiento. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando el acceso a los centros de tratamiento es limitado. En este contexto, las etapas (a) y (b) se pueden llevar a cabo de manera simultánea, o se pueden llevar a cabo con 24 horas de diferencia, menos de 12 horas de diferencia, menos
15 de 10 horas de diferencia, menos de 6 horas de diferencia, menos de 4 horas de diferencia, menos de 3 horas de diferencia o menos de 2 horas de diferencia.

La etapa (a) se puede llevar a cabo en múltiples instancias adicionales después de la primera instancia. Es decir, el sujeto puede recibir una serie de dosis de anticuerpo anti-CD40. Estas dosis se administran de modo que el sujeto
20 tenga solo una exposición intermitente al anticuerpo anti-CD40, preferentemente, de modo que las células inmunitarias del sujeto no disminuyan y/o que el sujeto no padezca taquifilaxia al anticuerpo anti-CD40. Ante la detección de estos síntomas, la siguiente administración del anticuerpo anti-CD40 se puede retrasar o cancelar. Si se administran múltiples dosis de anti-CD40, la etapa (b) se lleva a cabo preferentemente de manera que, después del inicio de la etapa (b), se permita la exposición continua del sujeto al agente terapéutico adicional en la duración
25 el método, que incluye durante cualquier segunda instancia o instancias adicionales de la etapa (a). Esto puede ser particularmente adecuado cuando el agente adicional es un agente (tal como un anticuerpo anti-PD1 o anti-PDL1) que bloquea o inhibe la actividad de un punto de control del sistema inmunitario. El bloqueo del receptor continuo puede ser particularmente importante para los efectos terapéuticos de esos agentes.

30 *Etapas (a)*

La etapa (a) del método incluye la administración local o sistémica de un anticuerpo anti-CD40 a un sujeto que tiene un tumor sólido. Se prefiere la administración local en el sitio tumoral e incluye administración peritumoral, juxtatumoral, intratumoral, intralesional, perilesional, intracraneal e intravesicular a través de cualquier medio, tal
35 como inyección. La administración local también puede incluir infusión intracavidad e inhalación, según el sitio tumoral.

Una alta proporción del anticuerpo anti-CD40 se retendrá en el sitio tumoral *in vivo*, es decir, dentro del microentorno tumoral, durante un período prolongado después de la administración de tal anticuerpo. Es decir, el anticuerpo
40 exhibe una pérdida reducida desde el sitio tumoral hacia la circulación vascular o linfática, en particular, cuando se administra de manera local en el sitio tumoral. Preferentemente, al menos 30 % de una dosis de anticuerpo administrada en un tumor de acuerdo con el método se retiene en el sitio tumoral 4 horas después de la administración, con mayor preferencia, al menos 40 % de la dosis se retiene 4 horas después de la administración y, con máxima preferencia, al menos 50 % de la dosis se retiene 4 horas después de la administración.

La retención de anticuerpos en un microentorno tumoral se puede estudiar mediante la inyección del anticuerpo en tumores en modelos murinos y la medición de niveles en suero del anticuerpo con el tiempo después de la
45 administración. De manera alternativa, la distribución de un anticuerpo se puede medir usando anticuerpos radioetiquetados inyectados en tumores en modelos murinos. Las técnicas adecuadas se describen en los Ejemplos.

El pH en un microentorno tumoral *in vivo* es considerablemente más ácido que el de los tejidos saludables. Los rangos para tumores se indican como alrededor de pH 6,5 a 7,2 o 6,6 a 7,0, en comparación con 7,2 a 7,4 para tejidos saludables. Esta acidez se produce principalmente debido a la glucólisis anaeróbica en regiones tumorales que se someten a hipoxia de corto plazo o largo plazo como resultado de vasculatura poco organizada con flujo
50 sanguíneo caótico reducido, y glucólisis aeróbica (el efecto Warburg), una propiedad fenotípica común del cáncer en la que las vías metabólicas glucolíticas se usan incluso en presencia de oxígeno. Debido a esta acidez, un anticuerpo anti-CD40 usado en el método descrito en el presente documento puede preferentemente tener un punto isoelectrico alto, ya que esto producirá una retención mejorada en el microentorno tumoral con respecto a un anticuerpo similar con un punto isoelectrico menor.

El punto isoelectrico de un anticuerpo se puede determinar mediante cualquier método adecuado. Se puede determinar *in vitro*, por ejemplo, mediante métodos electroforéticos. De manera alternativa, el punto isoelectrico se puede calcular a partir de principios básicos. En este caso, el punto isoelectrico resultante se denomina generalmente punto isoelectrico teórico. Existen muchos programas informáticos para el cálculo *in silico* del punto
55 isoelectrico teórico, por ejemplo, GP-MAW (versión 9.2, de Lighthouse Data). Un anticuerpo anti-CD40 usado en el método descrito en el presente documento tiene, preferentemente, un punto isoelectrico teórico (pI) de 9,0 o más,

preferentemente, 9,1 o más, con mayor preferencia, 9,2 o más, o 9,25 o más, con máxima preferencia, 9,3 o más.

Etapa (b)

- 5 La etapa (b) del método incluye la administración sistémica de un agente terapéutico adicional a un sujeto. Administración sistémica de cualquier agente descrito en la presente (que incluye el anticuerpo anti-CD40 de la etapa (a)) significa la administración en el sistema circulatorio del sujeto, que incluye el sistema vascular y/o linfático. Esa administración puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, pero generalmente es parenteral.
- 10 Como se usa en la presente, la frase "administración parenteral" significa modos de administración que no son administración entérica ni tópica, y suele lograrse mediante inyección, infusión o implantación. Las vías adecuadas incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, intracerebral, intratecal, intraósea u otras vías de administración parenteral.

15 Anticuerpos

General

- 20 Como se usa en la presente, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de fijación al antígeno (es decir, "porción de fijación al antígeno") o cadenas simples de estos. Un "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por puentes disulfuro, o una porción de fijación al antígeno de esta. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en la presente como VH) y una región constante de la cadena pesada. En determinados anticuerpos naturales, cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como VL) y una región constante de la cadena ligera. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera contienen un dominio de fijación que interactúa con un antígeno. Las regiones VH y VL también se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la fijación de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluso distintas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema complementario clásico.

- 35 Las cadenas pesadas pueden ser de cualquier isotipo, que incluye IgG (subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (subtipos IgA1 e IgA2), IgM e IgE.

Las cadenas ligeras incluyen cadenas kappa y cadenas lambda.

- 40 Son de particular importancia los anticuerpos y sus fragmentos de fijación al antígeno que se "aislaron" para existir en un medio físico diferente del que puede existir en la naturaleza o que se modificó para diferenciarse de un anticuerpo natural en la secuencia de aminoácidos.

- 45 Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo se puede producir mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, los métodos adecuados para producir anticuerpos monoclonales se describen 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). También se pueden usar técnicas recombinantes.

- 50 La expresión "porción de fijación al antígeno" o "fragmento de fijación al antígeno" de un anticuerpo se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de fijarse específicamente a un antígeno, tal como CD40. Se ha demostrado que la función de fijación al antígeno de un anticuerpo se puede llevar a cabo mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de fijación incluidos dentro de la expresión "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento dAb y una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). También se pretende que los anticuerpos de cadena única, tales como scFv y los anticuerpos de la cadena pesada, tales como VHH, y anticuerpos de camello se incluyan dentro de la expresión "porción de fijación al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden obtener usando técnicas convencionales conocidas por las personas del oficio de nivel medio, y se pueden analizar los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera que con los anticuerpos intactos.

- 60 Un anticuerpo para usar en los métodos descritos en el presente documento puede ser un anticuerpo humano. Como se usa en la presente, la expresión "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables en donde las regiones marco y las CDR derivan de secuencias de inmunoglobulinas germinales humanas. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, esta también deriva de las secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas al azar, mutagénesis específica de sitio *in vitro* o mutación somática *in vivo*). Sin embargo, como se usa en la presente, la

expresión “anticuerpo humano” no incluye anticuerpos en donde las secuencias de CDR que derivan de la línea germinal de otras especies de mamíferos, como ratón, se injertaron en secuencias de marco humanas; tales anticuerpos se denominan generalmente “quiméricos” o “humanizados”.

5 Un anticuerpo humano para usar en los métodos descritos en el presente documento es generalmente un anticuerpo monoclonal humano. Tal anticuerpo monoclonal humano se puede producir mediante un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionado a una célula
10 humanizada. Los anticuerpos humanos también se pueden preparar mediante inmunización *in vitro* de linfocitos humanos y luego mediante la transformación de los linfocitos con virus Epstein-Barr. La expresión “derivados de anticuerpos humanos” se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

15 Un anticuerpo para usar en los métodos descritos en el presente documento puede ser, como alternativa, un anticuerpo humanizado.

El término “humanizado” se refiere a una molécula de anticuerpo, preparada generalmente mediante técnicas recombinantes, que tienen un sitio de fijación al antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y una estructura de inmunoglobulina restante en función de la estructura y/o la secuencia de una
20 inmunoglobulina humana. El sitio de fijación al antígeno puede comprender dominios variables completos de anticuerpo no humano fusionados a dominios constantes humanos, o solo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de tales dominios variables injertados en regiones de marco humanas adecuadas de dominios variables humanos. Los residuos de marco de tales moléculas humanizadas pueden ser de tipo silvestre (por ejemplo, totalmente humano) o se pueden modificar para contener una o más sustituciones de aminoácidos no encontrados en el anticuerpo humano cuya secuencia sirvió como la base para la humanización. La humanización reduce o elimina la probabilidad de que una región constante de la molécula actúe como un inmunógeno en individuos humanos, pero permanece la posibilidad de una respuesta inmunitaria a la región variable exógena (LoBuglio, A.F. *et al.* (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 86:4220-4224). Otro enfoque se centra no solo en la provisión de regiones constantes derivadas de seres humanos, sino también en la modificación de regiones variables para remodelarlas y
30 tornarlas lo más parecido posible a la forma humana. Se sabe que las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen 3 regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los antígenos en cuestión y determinan la capacidad de fijación, flanqueadas por 4 regiones de marco (FR) que son relativamente conservadas en una especie determinada y que proporcionan aparentemente un soporte para las CDR. Cuando los anticuerpos no humanos se preparan con respecto a un antígeno particular, las regiones variables se pueden “remodelar” o “humanizar” mediante el injerto de CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano que se debe modificar. La aplicación de este enfoque a diversos anticuerpos se informa en Sato, K. *et al.* (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. *et al.* (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy,*” Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. *et al.* (1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,*” Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. *et al.* (1991) “*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,*” Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. *et al.* (1991) “*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,*” Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. *et al.* (1991) “*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. *et al.* (1991) “*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,*” Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. *et al.* (1991) “*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 88:2869-2873; Carter, P. *et al.* (1992) “*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.) 89:4285-4289; y Co, M.S. *et al.* (1992) “*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,*” J. Immunol. 148:1149-1154. En algunas formas de realización, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo humanizado de ratón que contiene las 6 CDR de los anticuerpos de ratón). En otras formas de realización, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (1, 2, 3, 4, 5, 6) que se alteran con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR “derivadas de” una o más CDR del anticuerpo original. La capacidad de humanizar un antígeno es conocida (véase, por ejemplo, patentes estadounidenses N.ºs 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.859.205; 6.407.213; 6.881.557).

55 Cualquier anticuerpo mencionado en la presente se puede proporcionar en forma aislada o se puede proporcionar opcionalmente unido (directa o indirectamente) a otra porción. La otra porción puede ser una molécula terapéutica, tal como una porción citotóxica o un fármaco.

60 La molécula terapéutica puede estar unida directamente, por ejemplo, mediante conjugación química, a un anticuerpo de la invención. Los métodos para conjugar moléculas a un anticuerpo son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, la conjugación de carbodiimida (Bauminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159) se puede usar para conjugar varios agentes, que incluye doxorubicina, con anticuerpos o péptidos. La carbodiimida hidrosoluble, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) es particularmente útil para conjugar una porción
65 funcional con una porción de fijación.

También se pueden usar otros métodos para conjugar una porción a anticuerpos. Por ejemplo, se puede usar oxidación de periodato de sodio y luego alquilación reductora de reactivos adecuados, así como reticulación con glutaraldehído. Sin embargo, se reconoce que, independientemente de qué método se seleccione para producir un conjugado, se debe realizar una determinación de que el anticuerpo mantiene su capacidad de direccionamiento y que la porción funcional mantiene su función relevante.

Una porción citotóxica puede ser directa y/o indirectamente citotóxica. "Directamente citotóxica" significa que la porción es una porción que por sí misma es citotóxica. "Indirectamente citotóxica" significa que la porción es una porción que, a pesar de que no es citotóxica en sí misma, puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, mediante su acción en una molécula adicional o mediante acción adicional sobre ella. La porción citotóxica puede ser citotóxica solo cuando es intracelular y es preferentemente no citotóxica cuando es extracelular.

Preferentemente, el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno, está unido a una porción citotóxica que es un agente quimioterapéutico directamente citotóxico. Opcionalmente, la porción citotóxica es un polipéptido directamente citotóxico. Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos son conocidos en el estado de la técnica.

Los agentes quimioterapéuticos citotóxicos, tales como agentes antineoplásicos, incluyen: agentes alquilantes que incluyen mostazas nitrogenada, tales como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo; etileniminas y metilmelaminas, tales como hexametilmelamina, tiotepa; alquilsulfonatos, tales como busulfano; nitrosoureas, tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil-CCNU) estreptozocina (estreptozotocina); y triacenos, tales como decarbazina (DTIC; dimetiltriazenoimidazol-carboxamida); antimetabolitos que incluyen análogos de ácido fólico, tales como metotrexato (ametofterina); análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo (5-fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodeoxiuridina; FUdR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de purina e inhibidores relacionados, tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicoformicina). Los productos naturales 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. Los agentes misceláneos incluyen complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracendiona, tal como mitoxantrona y antraciclina; urea sustituida, tal como hidroxiiurea; derivado de metilhidrazina, tal como procarbazona (N-metilhidrazina, MIH); e inhibidor corticosuprarrenal, tal como mitotano (o,p'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos/derivados; y agonistas/antagonistas hormonales, tales como flutamida y tamoxifeno.

La porción citotóxica puede ser una porción péptido o polipéptido citotóxica que produce muerte celular. Las porciones péptido y polipéptido citotóxicas son conocidas en el estado de la técnica e incluyen, por ejemplo, ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, factor tisular y similares. Los métodos para unirlos a porciones diana, tales como anticuerpos, también son conocidos en el estado de la técnica. Otras proteínas inactivadoras de ribosomas se describen como agentes citotóxicos en WO 96/06641. La exotoxina de *Pseudomonas* también se puede usar como polipéptido citotóxico. Determinadas citocinas, tales como TNF α e IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos.

Determinados átomos radiactivos también pueden ser citotóxicos si se administran en dosis suficientes. Por ende, la porción citotóxica puede comprender un átomo radiactivo que, en uso, administra una cantidad suficiente de radiactividad al sitio diana para que sea citotóxico. Los átomos radiactivos 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 vecinas, organelas o ácidos nucleicos. Preferentemente, los isótopos y la densidad de los átomos radiactivos en los agentes descritos en el presente documento son tales que una dosis de más de 4000 cGy (preferentemente, al menos 6000, 8000 o 10000 cGy) se administra al sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y sus organelas, en particular, el núcleo.

El átomo radiactivo se puede unir al anticuerpo, fragmento de fijación al antígeno, variante, fusión o derivado de aquel en formas conocidas. Por ejemplo, EDTA u otro agente quelante se puede unir a la porción de fijación y se puede usar para unir ^{111}In o ^{90}Y . Los residuos de tirosina se pueden etiquetar directamente con ^{125}I o ^{131}I .

La porción citotóxica puede ser un polipéptido indirectamente citotóxico. El polipéptido indirectamente citotóxico puede ser un polipéptido que tiene actividad enzimática y puede convertir un profármaco no tóxico y/o relativamente no tóxico en un fármaco citotóxico. Con anticuerpos, este tipo de sistema a menudo se denomina ADEPT (tratamiento enzimático con profármaco dirigido por anticuerpos). El sistema requiere que el anticuerpo ubique la porción enzimática en el sitio deseado en el cuerpo del paciente y, después de dejar pasar tiempo para que la enzima se ubique en el sitio, administre un profármaco que es un sustrato para la enzima, en donde el producto final de la catálisis es un compuesto citotóxico. El objeto del enfoque es maximizar la concentración del fármaco en el sitio deseado y minimizar la concentración de profármaco en tejidos normales. La porción citotóxica puede convertir un profármaco no citotóxico en un fármaco citotóxico.

La enzima y el profármaco del sistema que utiliza una enzima diana descrita en la presente puede ser cualquiera de

los propuestos anteriormente. La sustancia citotóxica puede ser cualquier fármaco antineoplásico existente, tal como un agente alquilante; un agente que se intercala en ADN; un agente que inhibe cualquier enzima clave, tal como dihidrofolato reductasa, timidina sintetasa, ribonucleótido reductasa, nucleósido quinasas o topoisomerasa; o un agente que produce muerte celular mediante la interacción con cualquier otro constituyente celular. El etopósido es un ejemplo de un inhibidor de topoisomerasa.

Los sistemas de profármacos informados incluyen aquellos enumerados en la Tabla 1.

TABLA 1

| Enzima | Profármaco |
|---------------------|--|
| Carboxipeptidasa G2 | Derivados de mostazas de ácido L-glutámico y ácido benzoico, mostazas de anilina, mostazas de fenol y mostazas de fenilendiamina; derivados fluorinados de estos |
| Fosfatasa alcalina | Fosfato de etopósido Fosfato de mitomicina |
| Beta-glucuronidasa | Glucurónido de mostaza de p-hidroxianilina Glucurónido de epirrubicina |
| Penicilin-V-amidasa | Adriamicin-N fenoxiacetilo |
| Penicilin-G-amidasa | N-(4'-hidroxifenil acetil) palitoxina Doxorrubicina y melfalán |
| Beta-lactamasa | Mostaza nitrogenada de cefalosporina p-fenilendiamina; derivados de doxorrubicina; 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 |

Las enzimas adecuadas para formar parte de una porción enzimática incluyen: exopeptidasas, tales como carboxipeptidasas G, G1 y G2 (para profármacos de mostaza glutamida), carboxipeptidasas A y B (para profármacos a base de MTX) y aminopeptidasas (para profármacos de 2- α -aminocilo MTC); endopeptidasas, tales como trombolisina (para profármacos de trombina); hidrolasas, tales como fosfatasa (por ejemplo, fosfatasa alcalina) o sulfatasas (por ejemplo, arilsulfatasas) (para profármacos fosfilados o sulfatados); amidasas, tales como penicilina amidasas y arlacil amidasa; lactamasas, tales como β -lactamasas; glucosidasas, tales como β -glucuronidasa (para β -glucuronomida antraciclinas), α -galactosidasa (para amigdalina) y β -galactosidasa (para β -galactosa antraciclina); desaminasas, tales como citosina desaminasa (para 5FC); quinasas, tales como uroquinasa y timidina quinasa (para ganciclovir); reductasas, tales como nitrorreductasa (para CB1954 y análogos), azorreductasa (para mostazas de azobenceno) y DT-diaforasa (para CB1954); oxidasas, tales como glucosa oxidasa (para glucosa), xantina oxidasa (para xantina) y lactoperoxidasa; DL-racemasas, anticuerpos catalíticos y ciclodextrinas.

Preferentemente, el profármaco es relativamente no tóxico en comparación con el fármaco citotóxico. En general, tiene menos de 10 % de toxicidad, preferentemente, menos de 1 % de la toxicidad medida en una prueba de citotoxicidad *in vitro* adecuada.

Es posible que la porción que puede convertir un profármaco en un fármaco citotóxico sea activa aislada del resto del agente de la invención, pero solo es necesario que sea activa cuando (a) se encuentra en combinación con el resto del agente de la invención y (b) el agente de la invención está unido a las células dianas, está adyacente a estas o está internalizado en estas.

Cuando cada porción es un polipéptido, las dos porciones pueden unirse mediante cualquiera de los medios convencionales de polipéptidos de reticulación. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de fijación al antígeno puede estar enriquecido con grupos tiol, y la porción adicional puede reaccionar con un agente bifuncional que puede reaccionar con aquellos grupos tiol, por ejemplo, el éster de N-hidroxisuccinimida del ácido iodoacético (NHIA) o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Los enlaces de amida y tioéter, por ejemplo, que se lograron con éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, son generalmente más estables *in vivo* que los puentes de disulfuro.

La porción citotóxica puede ser un radiosensibilizador. Los radiosensibilizadores incluyen fluoropirimidinas, análogos de timidina, hidroxiaurea, gemcitabina, fludarabina, nicotinamida, pirimidinas halogenadas, 3-aminobenzamida, 3-aminobenzodiamida, etanixadol, pimonidazol y misonidazol. Asimismo, la administración de genes en células puede radiosensibilizarlas, por ejemplo, la administración del gen p53 o ciclina D. La porción adicional puede ser una que se vuelva citotóxica, o libere una porción citotóxica, después de la radiación. Por ejemplo, el isótopo de boro-10, cuando se irradia de manera adecuada, libera partículas α que son citotóxicas. De manera similar, la porción citotóxica puede ser una porción que sea útil en el tratamiento fotodinámico, tal como fotofrina.

Anticuerpos específicos contra CD40

Los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento utilizan un anticuerpo que se fija inmunoespecíficamente a CD40, es decir, un "anticuerpo anti-CD40". En una forma de realización, tal anticuerpo se retiene en el sitio tumoral después de la administración a un sujeto (véase el análisis en la etapa (a) anterior)). Preferentemente, el anticuerpo se fija específicamente a CD40, es decir, se fija a CD40 pero no se fija, o se fija en una afinidad menor (por ejemplo, una afinidad 10 veces menor), a otras moléculas. A menos que se especifique lo contrario, el término CD40 como se usa en la presente, se refiere a CD40 humana. La secuencia de CD40 humana se presenta en SEQ ID NO: 13. Un anticuerpo anti-CD40 de la presente invención puede tener un poco de afinidad de fijación a CD40 de otros mamíferos, por ejemplo, CD40 murina o de primate. El anticuerpo se fija, preferentemente, a CD40 humana cuando se ubica en la superficie de una célula.

En particular, los anticuerpos anti-CD40 usados en los tratamientos combinados descritos en el presente documento compiten por la fijación a CD40 humana con un 'anticuerpo de referencia' que comprende la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8 (opcionalmente junto con las regiones constantes ligeras y pesadas de SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12, respectivamente). Tal inhibición de fijación competitiva se puede determinar usando ensayos y métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, mediante el uso de chips BIAcore con CD40 humana inmovilizada y la incubación en presencia del anticuerpo de referencia, con y sin un polipéptido de anticuerpo que se debe evaluar. De manera alternativa, se puede usar un enfoque de mapeo de pares, en el que el anticuerpo de referencia se inmoviliza a la superficie del chip BIAcore, la CD40 humana se une al anticuerpo inmovilizado, y luego un segundo anticuerpo se evalúa para determinar la capacidad de fijación a CD40 humana (véase 'BIAcore Assay Handbook', GE Healthcare Life Sciences, 29-0194-00 AA 05/2012).

Los anticuerpos anti-CD40 de ejemplo se describen en WO 2013/034904 de Alligator Bioscience AB.

Preferentemente, el anticuerpo tiene la capacidad de fijarse a CD40 en su estado nativo y, en particular, a CD40 ubicada en la superficie de una célula. Preferentemente, un anticuerpo se fijará específicamente a CD40. Es decir, un anticuerpo utilizado en los métodos de la invención se fijará preferentemente a CD40 con mayor afinidad de fijación que en la que se fijará a otra molécula.

"Ubicada en la superficie de una célula" significa que CD40 está asociada a la célula de modo que una o más regiones de CD40 están presentes en la cara externa de la superficie celular. Por ejemplo, CD40 se puede insertar en la membrana plasmática celular (es decir, orientada como una proteína de transmembrana) con una o más regiones presentadas en la superficie extracelular. Esto se puede producir durante el transcurso de la expresión de CD40 por parte de la célula. Por ende, en una forma de realización, "ubicada en la superficie de una célula" puede significar "expresada en la superficie de una célula". De manera alternativa, CD40 puede estar fuera de la célula con interacciones covalentes y/o iónicas que la ubican en una región o regiones específicas de la superficie celular.

Un anticuerpo anti-CD40 usado en los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento pueden inducir y/o mejorar la lisis mediada por ADCC de una célula que expresa CD40 y/o mejorar la apoptosis de una célula que expresa CD40. En general, la célula es una célula tumoral. "Mejorar" significa que la cantidad de células lisadas o sometidas a apoptosis aumenta en presencia de un anticuerpo de la invención, con respecto a la cantidad de células lisadas o sometidas a apoptosis en presencia de una sustancia de control adecuada. Los métodos para determinar el nivel de lisis mediada por ADCC o apoptosis en una muestra de células son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, también se pueden usar un ensayo de liberación de cromio-51, un ensayo de liberación de europio o un ensayo de liberación de azufre-35. En tales ensayos, una línea celular diana previamente etiquetada que expresa el antígeno (en este caso, CD40) se incuba con un anticuerpo que se debe evaluar. Después del lavado, las células efectoras (en general, que expresan el receptor Fc de CD16) se coincuban con las células diana etiquetadas con el anticuerpo. La lisis de células diana se mide posteriormente mediante la liberación de la etiqueta intracelular a través de un contador de centelleo o espectrofotometría.

Preferentemente, el anticuerpo, el fragmento de fijación al antígeno, comprende una región Fc del anticuerpo. Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que la porción Fc puede ser de un anticuerpo IgG, o de una clase distinta de anticuerpo (tal como IgM, IgA, IgD o IgE). Por ejemplo, la región Fc puede ser de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. De manera ventajosa, sin embargo, la región Fc es de un anticuerpo IgG1.

La región Fc puede ser natural (por ejemplo, parte de un anticuerpo producido endógenamente) o puede ser artificial (por ejemplo, que comprende una o más mutaciones puntuales en relación con la región Fc natural). Las regiones Fc con mutaciones puntuales que mejoran la capacidad de fijarse a FcR pueden ser ventajosas, por ejemplo, mediante la alteración de la semivida en suero, o pueden mejorar la fijación a receptores de Fcγ (FcγR) involucrados en ADCC y CDC. En particular, las mutaciones que mejoran la fijación a FcγRIIB, por ejemplo, S267E (Strohl *et al.*, 2009, *Curr Opin Biotechnol*, 20:685–691) pueden ser ventajosas para la invención, lo que proporciona la unión entre la fijación a FcγRIIB y la actividad funcional de anticuerpos contra CD40 (Li *et al.*, 2011, *Science*, 333: 1030-1034).

Como una alternativa al etiquetado con radioisótopos requeridos en tales ensayos, se pueden usar métodos en los

que la lisis se detecta mediante la medición de la liberación de enzimas presentes de manera natural en las células dianas. Esto se puede lograr mediante la detección (por ejemplo, detección de bioluminiscencia) de los productos de una reacción catalizada por enzimas. No se necesita etiquetado previo de las células en ese ensayo. Una enzima celular típica detectada con ese ensayo es GAPDH.

5 Un anticuerpo anti-CD40 usado en los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento puede modular la actividad de una célula que expresa CD40, en donde tal modulación es un aumento o una reducción en la actividad de tal célula. En general, la célula es una célula dendrítica o un linfocito B.

10 Las APC, tales como células dendríticas, se activan cuando se produce la señalización mediante CD40, lo que desencadena varios eventos biológicos, que incluyen la activación de células inmunitarias, la proliferación y producción de citocinas y quimiocinas. Los métodos para determinar la activación de células dendríticas asociadas a CD40 son conocidos en el estado de la técnica (analizados, 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 adicionalmente más adelante.

15 La estimulación de linfocitos B humanos con CD40L recombinante o anticuerpos anti-CD40 induce la regulación ascendente de los marcadores de superficie, tales como CD23, CD30, CD80, CD86, Fas y MHC II, la secreción de citocinas solubles, por ejemplo, IL-6, TNF- γ y TNF- α , y la agregación homeotípica. Los métodos para determinar la activación de linfocitos B relacionados con CD40 son conocidos en el estado de la técnica (analizados, por ejemplo, en Schonbeck et al., 2001, *supra*) y se describen adicionalmente más adelante.

20 Los métodos y ensayos para determinar la capacidad de un anticuerpo para modular la actividad de células dendríticas y linfocitos B son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, la activación de células dendríticas se puede evaluar midiendo de marcadores de la superficie celular, tales como CD86 y CD80, y/o midiendo la secreción inducida por anticuerpos anti-CD40 de IFN γ de linfocitos T, en donde un aumento de cualquier de estos parámetros indica mayor activación y una reducción representa menor activación. De manera similar, la capacidad de un anticuerpo para modular la actividad de linfocitos B se puede evaluar midiendo el nivel de los marcadores de la superficie celular (tales como CD86) y/o midiendo la proliferación de linfocitos B inducidos por anticuerpos anti-CD40 (véase el Ejemplo 3 más adelante), en donde un aumento de cualquiera de estos parámetros indica mayor
30 activación y una reducción representa menor activación.

Preferentemente, un anticuerpo anti-CD40 usado en los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento que aumenta la activación de células dendríticas o linfocitos B tiene una potencia para la activación de células dendríticas o linfocitos B. En general, la activación celular se puede medir como un nivel de EC50 en un ensayo que incluye incubar células dendríticas o linfocitos B aislados con el estimulador de prueba y luego detectar la proliferación celular como la medida de activación.

35 Las expresiones "actividad de fijación" y "afinidad de fijación" se refieren a la tendencia de una molécula de anticuerpo para fijarse o para no fijarse a una diana. La afinidad de fijación se puede cuantificar determinando la constante de disociación (Kd) para un anticuerpo y su diana. De manera similar, la especificidad de fijación de un anticuerpo a su diana se puede definir en términos de constantes de disociación comparativas (Kd) del anticuerpo para su diana en comparación con la constante de disociación con respecto al anticuerpo y a otra molécula no diana.

40 Con frecuencia, la Kd para el anticuerpo con respecto a la diana será 2 veces, preferentemente, 5 veces, con mayor preferencia, 10 veces menor que la Kd con respecto a la otra molécula no diana, tal como material no relacionado o material que acompaña en el entorno. Con mayor preferencia, la Kd será 50 veces menor, aun con mayor preferencia, 100 veces menor e, incluso con mayor preferencia, 200 veces menor.

45 El valor de esta constante de disociación se puede determinar directamente mediante métodos conocidos, y se puede computar incluso con respecto a mezclas complejas mediante métodos, tales como los indicados en Caceci et al. (*Byte* 9:340-362, 1984). Por ejemplo, la Kd se puede establecer usando un ensayo de fijación de nitrocelulosa con doble filtro, tal como se describe en Wong & Lohman (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90, 5428-5432, 1993). En el estado de la técnica, se conocen otros ensayos estándares para evaluar la afinidad de fijación de ligandos, tales como anticuerpos que se dirigen a dianas; los ensayos incluyen, por ejemplo, ELISA, transferencia Western, RIA y análisis de citometría de flujo. La cinética de fijación (por ejemplo, afinidad de fijación) del anticuerpo también se puede evaluar mediante ensayos estándares conocidos en el estado de la técnica, tal como mediante análisis del sistema Biacore™.

50 Se puede llevar a cabo un ensayo de fijación competitiva en donde la fijación del anticuerpo a la diana se compara con la fijación de la diana mediante otro ligando conocido de esa diana, tal como otro anticuerpo. La concentración a la cual se produce el 50 % de inhibición se conoce como Ki. En condiciones ideales, la Ki es equivalente a la Kd. El valor Ki nunca será menor que el de Kd; por lo tanto, la medición de Ki se puede sustituir de manera conveniente para brindar un límite superior a Kd.

60 Un anticuerpo anti-CD40 usado en los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento se puede fijar, preferentemente, a su diana con una afinidad que es al menos 2 veces, 10 veces, 50 veces, 100

veces o más que su afinidad de fijación a otra molécula no diana.

Un anticuerpo usado en los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento generalmente exhibirán la capacidad de:

- 5
- (i) fijarse específicamente a CD40 humana cuando se ubica en la superficie de una célula; y/o
 - (ii) mejorar la lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de una célula que expresa CD40; y/o
 - (iii) mejorar la apoptosis de una célula que expresa CD40; y/o
 - 10 (iv) modular la actividad de una célula que expresa CD40, en donde tal modulación es un aumento o una reducción de la actividad de esa célula.

15 El anticuerpo puede ser o puede comprender una variante o un fragmento de uno de los anticuerpos anti-CD40 específicos descritos en la presente, siempre que tal variante o fragmento retenga la especificidad para CD40, y al menos una de las características funcionales (i) a (iv).

20 Un fragmento es preferentemente una porción de fijación al antígeno de tal anticuerpo. Un fragmento se puede obtener mediante truncamiento, por ejemplo, mediante eliminación de uno o más aminoácidos de los extremos del terminal N y/o C de un polipéptido. De esta manera, se pueden eliminar hasta 10, hasta 20, hasta 30, hasta 40 o más aminoácidos del terminal N y/o C. Asimismo, se pueden generar fragmentos mediante una o más eliminaciones internas.

25 Una variante puede comprender una o más sustituciones, eliminaciones o adiciones con respecto a las secuencias de un anticuerpo anti-CD40 específico descrito en la presente. Una variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, hasta 10, hasta 20, hasta 30 o más sustituciones y/o eliminaciones de aminoácidos de las secuencias específicas descritas en la presente. Las variantes de "eliminación" pueden comprender la eliminación de aminoácidos individuales, la eliminación de pequeños grupos de aminoácidos, tales como 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, o la eliminación de regiones de aminoácidos más grandes, tal como la eliminación de dominios de aminoácidos específicos u otras características. Preferentemente, las variantes de "sustitución" implican el reemplazo de uno o más aminoácidos por la misma cantidad de aminoácidos, y realizar sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, un aminoácido se puede sustituir con un aminoácido alternativo que tiene propiedades similares, por ejemplo, otro aminoácido básico, otro aminoácido ácido, otro aminoácido neutro, otro aminoácido cargado, otro aminoácido hidrófilo, otro aminoácido hidrófobo, otro aminoácido polar, otro aminoácido aromático u otro aminoácido alifático.

35 Algunas propiedades de los 20 aminoácidos principales que se pueden usar para seleccionar sustituyentes adecuados son las siguientes:

| | | | |
|-----|--|-----|-------------------------------|
| Ala | alifático, hidrófobo, neutral | Met | hidrófobo, neutral |
| Cys | polar, hidrófobo, neutral | Asn | polar, hidrófilo, neutral |
| Asp | polar, hidrófilo, cargado (-) | Pro | hidrófobo, neutral |
| Glu | polar, hidrófilo, cargado (-) | Gln | polar, hidrófilo, neutral |
| Phe | aromático, hidrófobo, neutral | Arg | polar, hidrófilo, cargado (+) |
| Gly | alifático, neutral | Ser | polar, hidrófilo, neutral |
| His | aromático, polar, hidrófilo, cargado (+) | Thr | polar, hidrófilo, neutral |
| Ile | alifático, hidrófobo, neutral | Val | alifático, hidrófobo, neutral |
| Lys | polar, hidrófilo, cargado (+) | Trp | aromático, hidrófobo, neutral |
| Leu | alifático, hidrófobo, neutral | Tyr | aromático, polar, hidrófobo |

40 Las "variantes" preferidas incluyen aquellas en las que en vez del aminoácido natural, el aminoácido que aparece en la secuencia es un análogo estructural de este. Los aminoácidos usados en las secuencias también se pueden derivatizar o modificar, por ejemplo, etiquetar, lo que produce que la función del anticuerpo no sea considerablemente afectada de manera adversa.

45 Las variantes se pueden preparar durante la síntesis del anticuerpo o mediante la modificación después de la producción, o cuando el anticuerpo está en forma recombinante usando técnicas conocidas de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o escisión enzimática y/o ligadura de ácidos nucleicos.

50 Preferentemente, las variantes de anticuerpos tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de 60 %, o más de 70 %, por ejemplo, 75 u 80 %, preferentemente, más de 85 %, por ejemplo, más de 90 o 95 % de identidad de aminoácido con el dominio VL o VH de un anticuerpo descrito en la presente. Este nivel de identidad de aminoácido puede observarse a lo largo de la longitud completa de la secuencia SEQ ID NO relevante o sobre una parte de la secuencia, tal como a lo largo de 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 o más aminoácidos, según el tamaño del polipéptido de longitud completa.

55

Con relación a las secuencias de aminoácidos, la "identidad de secuencia" se refiere a secuencias que tienen el valor establecido cuando se evalúan usando ClustalW (Thompson *et al.*, 1994, *supra*) con los siguientes parámetros:

5 Parámetros de alineación de pares -Método: preciso, Matriz: PAM, Penalidad de apertura de espacios: 10,00, Penalidad por extensión de espacios: 0,10;
 10 Parámetros de múltiples alineaciones -Matriz: PAM, Penalidad por apertura de espacios: 10,00, % de identidad por retraso: 30, Penalizar espacios finales: activado, Distancia de separación de espacios: 0, Matriz negativa: no, Penalidad por extensión de espacios: 0,20, Penalidades de espacios específicos de residuo: activado, Penalidades por espacio hidrófilo: activado, Residuos hidrófilos: GPSNDQEKR. La identidad de secuencia en un residuo particular pretende incluir residuos idénticos que simplemente se derivatizaron.

15 Un anticuerpo anti-CD40 para usar en los tratamientos combinados descritos en el presente documento se puede fijar al mismo epítipo que un anticuerpo específico como se describe en la presente, ya que es posible que ese anticuerpo imite la acción del anticuerpo descrito. Mediante métodos de rutina se puede determinar si un anticuerpo se fija o no al mismo epítipo que otro anticuerpo. Por ejemplo, la fijación de cada anticuerpo a una diana se puede realizar mediante un ensayo de fijación competitivo. Los métodos para llevar a cabo ensayos de fijación competitiva son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, pueden incluir poner en contacto un anticuerpo y una molécula diana en condiciones en las que el anticuerpo se puede fijar a la molécula diana. Luego, el complejo anticuerpo/diana se puede poner en contacto con un segundo anticuerpo (de prueba), y se puede evaluar en qué
 20 grado el anticuerpo de prueba es capaz de desplazar al primer anticuerpo de los complejos anticuerpo/diana. Tal evaluación puede usar cualquier técnica adecuada, que incluye, por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales, ELISA o citometría de flujo. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la fijación de un primer anticuerpo a la diana demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con dicho primer anticuerpo por la fijación a la diana y, por ende, que el anticuerpo de prueba se fija al mismo epítipo o región en la diana que el
 25 primer anticuerpo, y por lo tanto, puede imitar la acción del primer anticuerpo.

Un anticuerpo anti-CD40 usado en los tratamientos combinados descrito en el presente documento comprende las 6 secuencias de CDR de SEQ ID NO: 1 a 6

30 El anticuerpo puede comprender la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y/o la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8.

35 El anticuerpo puede ser, o puede fijarse al mismo epítipo que, un anticuerpo que comprende la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8. Además, el anticuerpo puede comprender la secuencia de la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y/o la secuencia de la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 12.

40 El anticuerpo anti-CD40 o cualquier variante o fragmento de este usado en los tratamientos combinados y los métodos descritos en el presente documento tiene, preferentemente, un punto isoeléctrico teórico (pI) de 9,0 o más, preferentemente, 9,1 o más, con mayor preferencia, 9,2 o más, o 9,25 o más, con máxima preferencia, 9,3 o más.

Tratamientos combinados

45 Los kits y composiciones de la invención permiten un tratamiento combinado para usar en el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, que comprende (a) un anticuerpo tal como se describe en el presente documento, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40, y (b) un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, en donde el agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno de este, que se fija específicamente a CD40 compite por la fijación a CD40 humana con un anticuerpo que comprende la región variable de la cadena
 50 ligera de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8, y en donde el agente inmunoterapéutico adicional se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario.

55 Como se usan en la presente, las expresiones "tratamiento conjunto", "tratamiento combinado" o "en combinación" se refieren a cualquier forma de tratamiento concurrente o paralelo con al menos dos agentes terapéuticos distintos.

60 De acuerdo con algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, y el agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 se administran de manera simultánea, ya sea en la misma composición o en composiciones separadas. De acuerdo con otras formas de realización, el anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, y el agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 se administran de manera secuencial, es decir, el anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, se administran ya sea antes o después de la administración del agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de
 65 fijación al antígeno de este, y el agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 son concurrentes, es decir, el período de administración del

anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, y el del agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 se superponen entre sí. En algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, y el agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 no son concurrentes. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la administración del anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, finaliza antes de la administración del agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40. En algunas formas de realización, la administración del agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 finaliza antes de la administración del anticuerpo anti-CD40 o del fragmento de fijación al antígeno de este.

De acuerdo con algunas formas de realización, el anticuerpo anti-CD40, o el fragmento de fijación al antígeno de este, y el agente inmunoterapéutico que se fija específicamente a una molécula de puntos de control del sistema inmunitario que no es CD40 se administran dentro de una sola composición terapéutica. De acuerdo con algunas formas de realización, la composición terapéutica comprende también diluyentes o portadores aceptables desde el punto de vista terapéutico.

El componente adicional de los tratamientos combinados de la invención es un agente inmunoterapéutico con eficacia en el tratamiento del cáncer, en donde el agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1.

La expresión "agente inmunoterapéutico" incluye cualquier anticuerpo anti-PD-1 que puede estimular el sistema inmunitario de un huésped para generar una respuesta inmunitaria a un tumor o cáncer en el sujeto.

La expresión "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T y/o linfocitos B. Los ejemplos de respuestas inmunitarias incluyen respuestas de linfocitos T, por ejemplo, producción de citocinas y toxicidad celular. Además, el término respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias que son efectuadas indirectamente por la activación de linfocitos T, por ejemplo, producción de anticuerpos (respuestas humorales) y la activación de células sensibles a la citocina, por ejemplo, macrófagos.

La expresión "molécula de puntos de control del sistema inmunitario" incluye un grupo de proteínas sobre la superficie celular de las células inmunitarias, tales como linfocitos T CD4+ y/o CD8+, células dendríticas, células NK y macrófagos, pero también sobre algunas células tumorales que modulan las respuestas inmunitarias.

El bloqueo o la neutralización de una o más moléculas inhibitoras de los puntos de control del sistema inmunitario puede bloquear, o bien neutralizar, la señalización inhibitora para así regular de manera ascendente una respuesta inmunitaria, a fin de tratar el cáncer de manera más eficaz. Tales agentes pueden bloquear de manera directa la interacción entre uno o más inhibidores de los puntos de control del sistema inmunitario y sus receptores naturales (por ejemplo, anticuerpos) para evitar la señalización inhibitora y regular de manera ascendente una respuesta inmunitaria. De manera alternativa, los agentes pueden bloquear de manera indirecta la interacción entre una o más proteínas inhibitoras de los puntos de control del sistema inmunitario y sus receptores naturales para evitar la señalización inhibitora y regular de manera ascendente una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, una versión soluble de un ligando de la proteína de los puntos de control del sistema inmunitario, tal como un dominio extracelular estabilizado, se puede fijar a su receptor para reducir de manera indirecta la concentración eficaz del receptor para fijarse a un ligando adecuado.

La molécula PD1 de punto de control funciona como un regulador negativo de la activación de linfocitos T unidos a sus ligandos PD-L1 o PD-L2. PD-L1 en particular se expresa mediante varios tumores sólidos, que incluyen melanoma. Por lo tanto, estos tumores pueden regular de manera descendente los efectos antitumorales mediados por el sistema inmunitario a través de la activación de los receptores de PD-1 inhibidores en los linfocitos T. Mediante el bloqueo de la interacción entre PD1 y PD-L1, se puede eliminar un punto de control de la respuesta inmunitaria, lo que provoca el aumento de las respuestas de los linfocitos T antitumorales. Esta interacción puede ser bloqueada por un anticuerpo específico de PD1 o PD-L1 o cualquier otro agente adecuado. Tales anticuerpos y agentes pueden denominarse, en general, inhibidores de PD1.

Los anticuerpos anti-PD1 incluyen Nivolumab, Pembrolizumab, Lambrolizumab, Pidilizumab y AMP-224. Los anticuerpos anti-PD-L1 incluyen MEDI-4736 y MPDL3280A.

La combinación de un inhibidor de PD1 sistémico y un anticuerpo anti-CD40 local simplemente no es atractiva debido a la expresión de PD-L1 mediante los tumores. Esa combinación también podría ser beneficiosa para modular el entorno inmunodepresor general, afectando los linfocitos T reguladores y las células supresoras derivadas de mieloides (MSDC). Por ejemplo, los agonistas de CD40, tales como el anticuerpo anti-CD40 usado en el método descrito en el presente documento, modulan las MSDC y los macrófagos M2 asociados al tumor que expresa CD40, mientras que el inhibidor de PD1 modula los linfocitos T reguladores y las MSDC. Además, como se explicó anteriormente (véase el análisis con respecto al tiempo de las etapas (a) y (b)), se informó que la ligadura de CD40 mediante anticuerpos activa y madura células dendríticas que, al madurar, regulan de manera ascendente

PD-L 1 y 2, lo cual proporciona más razones para combinar los dos tratamientos. Asimismo, los agonistas de CD40, tales como el anticuerpo anti-CD40 usado en el método descrito en el presente documento regula indirectamente de manera ascendente PD-1 en los linfocitos T y PD-L1 en tumores y células que infiltran los tumores. Por ende, el tratamiento del tumor sólido (tal como melanoma) con una combinación de un inhibidor de PD1 sistémico y un anticuerpo anti-CD40 que se retiene en el sitio tumoral tendría efectos pleiotrópicos tanto mediante la activación del sistema inmunitario como mediante la supresión de las señales contrarreguladoras.

Con máxima preferencia, el agente terapéutico adicional es seleccionado de Nivolumab, Pembrolizumab, Lambrolizumab, Pdilizumab, MEDI-4736 y MPDL3280A.

Se comprenderá que todas las consideraciones generales establecidas anteriormente con respecto a las definiciones de los anticuerpos, fragmentos de fijación al antígeno de los anticuerpos, conjugación opcional con porciones terapéuticas adicionales, etc, también se aplican a un anticuerpo que es el agente terapéutico adicional. De manera similar, se comprenderá que las definiciones de especificidad/afinidad diana y métodos para determinar la especificidad/afinidad expuesta anteriormente para anticuerpos anti-CD40 se aplican de igual manera a un anticuerpo que es el agente terapéutico adicional, excepto porque se leerá la diana específica del agente en lugar de CD40. Las variantes y los fragmentos de un anticuerpo que es el agente terapéutico adicional también se pueden definir de la misma manera que las variantes y los fragmentos de anticuerpos anti-CD40.

Kits y composiciones farmacéuticas

La invención proporciona un kit para tratar un tumor sólido en un sujeto, como se definió anteriormente. Por lo tanto, el kit puede comprender (a) una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se fija específicamente a CD40 y que se retiene en el sitio tumoral después de la administración y, opcionalmente, (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico adicional que es adecuado para administración sistémica a un sujeto, cuyo agente es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1. El anticuerpo que se fija específicamente a CD40 se proporciona preferentemente en una forma adecuada para administración local en un sitio tumoral.

Los kits de la invención pueden comprender también uno o más reactivos distintos o instrumentos que permitan llevar a cabo cualquiera de las formas de realización mencionadas anteriormente. Tales reactivos o instrumentos incluyen uno o más de los siguientes: amortiguadores adecuados (soluciones acuosas) y medios para administrar el anticuerpo anti-CD40 y/o el agente terapéutico adicional (tal como un recipiente o un instrumento que comprende una aguja).

Cada uno del anticuerpo anti-CD40 y el agente terapéutico adicional, pueden proporcionarse como una composición farmacéutica separada formulada junto con un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Como se usa en la presente, un "portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes demoradores de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles y compatibles también con las vías de administración requeridas.

Por lo tanto, el portador del anticuerpo anti-CD40 y el agente terapéutico adicional pueden ser adecuados para la administración sistémica que, como se definió anteriormente, significa la administración en el sistema circulatorio del sujeto, que incluye el sistema vascular y/o linfático. Esa administración puede realizarse mediante cualquier vía adecuada, pero generalmente es parenteral. Como se usa en la presente, la frase "administración parenteral" significa modos de administración que no son administración entérica ni tópica, y suele lograrse mediante inyección, infusión o implantación. Las vías adecuadas incluyen la vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías de administración parenterales.

Sin embargo, el portador del anticuerpo anti-CD40 es preferentemente adecuado para administración local, que, como se definió anteriormente, incluye la administración peritumoral, juxtatumoral, intratumoral, intralesional, perilesional, intracraneal e intravesicular a través de cualquier medio adecuado, tal como inyección. La administración local también puede incluir infusión intracavidad e inhalación, según el sitio tumoral.

En función de la vía de administración, el anticuerpo y/o el agente se pueden recubrir con un material para proteger el anticuerpo de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar o desnaturalizar el anticuerpo y/o el agente. Los portadores aceptables desde el punto de vista farmacéutico preferidos comprenden portadores acuosos o diluyentes. Algunos ejemplos de portadores acuosos adecuados que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, agua amortiguada y solución salina. Algunos ejemplos de otros portadores incluyen etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La correcta fluidez se puede mantener, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y usando tensioactivos. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición.

Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que, generalmente, los componentes del anticuerpo de los tratamientos combinados descritos en el presente documento se proporcionan en forma de una o más composiciones farmacéuticas, cada una de las cuales contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de los componentes de anticuerpos junto con un amortiguador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, un excipiente, un diluyente o un portador.

Como se usa en la presente, una "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz", o "terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una afección y régimen de administración determinados. Esta es una cantidad predeterminada de anticuerpo activo calculado para producir un efecto terapéutico deseado en relación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un portador o vehículo de administración. Además, significa una cantidad suficiente para reducir o prevenir un déficit clínicamente considerable en la actividad, función y respuesta del huésped. De manera alternativa, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para causar una mejora en una afección clínicamente considerable en un huésped. Como entenderá una persona del oficio de nivel medio, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosis adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de una composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en relación con el diluyente requerido.

Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar por el médico o veterinario en función de las características del paciente, tales como edad, peso, sexo, condición, complicaciones, otras enfermedades, etc, como se conoce en el estado de la técnica.

Una composición farmacéutica puede incluir un antioxidante aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulgentes y dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede garantizar mediante procedimientos de esterilización, como se indicó anteriormente, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que demoran la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Con frecuencia, las composiciones farmacéuticas deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para obtener una concentración farmacológica alta. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del agente activo (por ejemplo, anticuerpo) en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con uno de los ingredientes mencionados anteriormente o una combinación de estos, según sea necesario, seguido de la microfiltración para su esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del agente activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización que producen un polvo del agente activo, más cualquier agente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración de aquel. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender ingredientes activos adicionales, además de las mencionadas anteriormente.

Los amortiguadores, diluyentes, portadores y excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico adecuados son conocidos en el estado de la técnica (véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a edición, A.R Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990) y el manual de Pharmaceutical Excipients, 3.^a edición, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000)).

El término "amortiguador" incluye una solución acuosa que contiene una mezcla a base de ácidos con el fin de estabilizar el pH. Los ejemplos de amortiguadores son Trizma, Bicine, tricina, 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" incluye 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 solución salina, agua, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

El término "adyuvante" incluye cualquier compuesto agregado a la formulación para aumentar el efecto biológico del agente de la invención. El adyuvante puede ser una o más sales de zinc, cobre o plata con aniones diferentes, por ejemplo, entre otros, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfito, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferentes composiciones de acilo. El adyuvante también puede ser polímeros catiónicos, tales como éteres de celulosa catiónicos, ésteres de celulosa catiónicos, ácido hialurónico desacetilado, quitosano, dendrímeros catiónicos, polímeros sintéticos catiónicos, tales como poli(vinil imidazol) y polipéptidos catiónicos, tales como polihistidina, polilisinas, poliarginina y péptidos que contienen estos aminoácidos.

Los excipientes pueden ser uno o más carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, glucosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se agregan a la composición, por ejemplo, para facilitar la liofilización. Los ejemplos de polímeros son almidón, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etil hidroxietil celulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de esto, ácido poliacrílico, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de polietilenóxido/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferentes grados de hidrólisis, y polivinilpirrolidona, todos de pesos moleculares diferentes, que se agregan a la composición, por ejemplo, para controlar la viscosidad, lograr la bioadhesión o proteger el lípido de la degradación química y proteolítica. Los ejemplos de lípidos son ácidos grasos, fosfolípidos, mono-, di- y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glucolípidos, todas las longitudes y saturaciones diferentes de la cadena de acilo, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de huevo y de soja hidrogenada, que se agregan a la composición por razones similares a las de los polímeros. Los ejemplos de minerales son talco, óxido de magnesio, óxido de zinc y óxido de titanio, que se agregaron a la composición para obtener beneficios, tales como la reducción de acumulación de líquidos o propiedades de pigmentación ventajosas.

Los agentes a base de anticuerpo activo de la invención se pueden formular en cualquier tipo de composición farmacéutica conocida en el estado de la técnica por ser adecuada para la administración.

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser en forma de un liposoma, en donde el agente se combina, además de con otro portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, con agentes tales como lípidos, que existen en formas agregadas como micelas, monocapas insolubles y cristales líquidos. Los lípidos aceptables para la formulación liposómica incluyen, entre otros, monoglicéridos, diglicéridos, sulfatidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. Los lípidos aceptables también incluyen los lípidos antes mencionados modificados con poli(etilenglicol) en el grupo principal polar para prolongar el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. La preparación de las formulaciones liposómicas se pueden encontrar por ejemplo en US 4.235.871.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser en la forma de microesferas biodegradables. Los poliésteres alifáticos, tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o poli(caprolactona) (PCL), y polianhídridos se usaron ampliamente como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de estas microesferas se pueden encontrar en US 5.851.451 y en EP 0 213 303.

En otra forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma de nanopartículas, por ejemplo, a base de ácido poli-gamma glutámico. Los detalles de la preparación y el uso de tales nanopartículas se pueden encontrar en WO 2011/128642. Las personas del oficio de nivel medio comprenderán que uno o más de los componentes activos de los tratamientos combinados de la presente invención se pueden preparar en nanopartículas separadas, o ambos componentes activos se pueden formular en las mismas nanopartículas.

En otra forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se proporcionan en forma de geles de polímeros, en donde polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, carboximetilcelulosa celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etil hidroxietil celulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados de este, ácido poliacrílico, polivinil imidazol, polisulfonato, polietilenglicol/óxido de polietileno, copolímeros de polietilenóxido/óxido de polipropileno, polivinilalcohol/polivinilacetato de diferentes grados de hidrólisis, y polivinilpirrolidona se usan para espesar la solución que contiene el agente. Los polímeros también pueden comprender gelatina o colágeno.

De manera alternativa, los agentes se pueden disolver simplemente en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de maní, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo), goma de tragacanto y/o diversos amortiguadores.

Se comprenderá que las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir iones y un pH definido para la potenciación de la acción del agente activo. De manera adicional, las composiciones se pueden someter a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulgentes, amortiguadores, agentes de relleno, etc.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada conocida por la persona del oficio de nivel medio. Por lo tanto, las posibles vías de administración incluyen parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), tópica, ocular, nasal, pulmonar, bucal, oral, parenteral, vaginal y rectal. También es posible la administración por medio de implantes.

Ventajosamente, la composición farmacéutica es adecuada para administrar en el sitio de un tumor o cerca de este, por ejemplo, por vía intratumoral o peritumoral.

Se prefiere que la composición farmacéutica sea adecuada para la administración parenteral. Los métodos para

formular una composición farmacéutica a partir de un anticuerpo son conocidos por las personas del oficio de nivel medio en los campos de la medicina y la farmacia. Las composiciones preferidas se describen en los Ejemplos adjuntos.

5 El tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede administrar mediante el uso de un sistema de administración de fármacos de liberación sostenida inyectable. Estos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de las inyecciones. Un ejemplo de tal sistema es Nutropin Depot, que encapsula la hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente durante un período prolongado. Preferentemente, la administración se realiza por vía intramuscular (i.m.)
10 y/o subcutánea (s.c.) y/o intravenosa (i.v.).

El tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede administrar mediante un dispositivo implantado con cirugía que libera el fármaco directamente en el sitio necesario. Por ejemplo, Vitrasert libera ganciclovir directamente en el ojo para tratar la retinitis por CMV. La aplicación directa de este agente tóxico en el
15 sitio de la enfermedad logra un tratamiento eficaz sin los efectos secundarios sistémicos significativos del fármaco.

Los sistemas de tratamiento de electroporación (EPT) también se pueden emplear para la administración del tratamiento combinado descrito en el presente documento. Un dispositivo que administra un campo eléctrico pulsado a las células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al fármaco, lo que da como resultado una
20 mejora significativa de la administración intracelular del fármaco.

El tratamiento combinado descrito en el presente documento también se puede administrar mediante electroincorporación (EI). La EI ocurre cuando pequeñas partículas de hasta 30 micrómetros de diámetro en la superficie de la piel experimentan impulsos eléctricos idénticos o similares a los usados en la electroporación. En la
25 EI, estas partículas son impulsadas a través de la capa córnea y hacia capas más internas de la piel. Las partículas se pueden cargar o cubrir con los fármacos o genes, o pueden actuar simplemente como "balas" que generan poros en la piel a través de los cuales pueden ingresar los fármacos.

Un tratamiento combinado alternativo es el sistema inyectable ReGel, que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, el ReGel es un líquido inyectable, mientras que a temperatura corporal, forma inmediatamente una reserva de gel que se erosiona y se disuelve lentamente hasta convertirse en polímeros seguros y biodegradables conocidos. La sustancia activa se administra durante un tiempo mientras los biopolímeros se
30 disuelven.

El tratamiento combinado descrito en el presente documento también se puede administrar por vía oral. El proceso emplea un proceso natural para la absorción oral de vitamina B₁₂ y/o vitamina D en el cuerpo para coadministrar proteínas y péptidos. Al usar el sistema de absorción de vitamina B₁₂ y/o vitamina D, los agentes, los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden moverse a través de la pared intestinal. Los complejos se sintetizan entre análogos de vitamina B₁₂ y/o análogos de vitamina D y el fármaco que tiene tanto afinidad
35 considerable con el factor intrínseco (IF) en la porción de vitamina B₁₂/porción de vitamina D del complejo como bioactividad considerable de la sustancia activa del complejo.

El tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede introducir en las células mediante "péptidos troyanos". Estos son una clase de polipéptidos denominados penetratinas, que tienen propiedades de translocación y son capaces de portar compuestos hidrófilos por la membrana plasmática. Este sistema permite el direccionamiento directo de oligopéptidos al citoplasma y al núcleo, y puede ser no específico de un tipo de célula y altamente eficaz. Véase Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol. 8, 84-87.
45

Preferentemente, el tratamiento combinado descrito en el presente documento es una dosis unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción adecuada de estas, del ingrediente activo.
50

Generalmente, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se administra por vía oral o por cualquier vía parenteral, en forma de una composición farmacéutica que comprende el ingrediente activo, opcionalmente en forma de un ácido o una base orgánicos, inorgánicos no tóxicos, sal de adición, en una forma de
55 dosis aceptable desde el punto de vista farmacéutico. En función del trastorno y el paciente que debe ser tratado, además de la vía de administración, las composiciones se pueden administrar en distintas dosis.

En el tratamiento en seres humanos, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede administrar solo, pero generalmente se administra mezclado con un excipiente, diluyente o portador farmacéutico adecuado seleccionado con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar.
60

Por ejemplo, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los agentes, los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar mediante inyección intracavernosa.
65

Tales comprimidos pueden contener excipientes, tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, desintegrantes, tales como almidón (preferentemente, almidón de maíz, papa o tapioca), almidón glicolato de sodio, croscarmelosa de sodio y algunos silicatos complejos, y aglutinantes de granulación, tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia. De manera adicional, se pueden incluir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También se pueden usar composiciones sólidas de un tipo similar como agentes de relleno en cápsulas de gelatinas. En este sentido, los excipientes preferidos incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los agentes, los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden combinar con distintos agentes endulzantes o saborizantes, colorantes o tinturas, con agentes emulgentes y/o de suspensión y con diluyentes, tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de estos.

El tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrasternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o se pueden administrar mediante técnicas de infusión. La mejor manera de usarlos es en forma de solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficiente sales o glucosa para que la solución sea isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deben ser amortiguadas de manera adecuada (preferentemente a un pH de 3 a 9), de ser necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándares conocidas por las personas del oficio de nivel medio.

Los medicamentos y las composiciones farmacéuticas adecuados para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación se torne isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes espesantes o de suspensión. Los medicamentos y las composiciones farmacéuticas se pueden presentar en dosis unitarias o recipientes de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en condiciones liofilizadas que requieren solo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

El tratamiento combinado descrito en el presente documento también se puede administrar por vía intranasal o mediante inhalación, y se administra convenientemente en forma de inhalador de polvo seco o en pulverizador en aerosol desde un recipiente presurizado, una bomba, un pulverizador o un 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 (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis unitaria se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. El recipiente presurizado, bomba, pulverizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión de agente activo, por ejemplo, usando una mezcla de etanol y el propulsor como el solvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (fabricados, por ejemplo, de gelatina) para usar en un inhalador o insuflador, que contengan una mezcla de polvo de un agente de la invención y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

De manera alternativa, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede administrar en forma de supositorio o pesario, o se puede aplicar de manera tópica en forma de loción, solución, crema, gel, pomada o polvo espolvoreable. Los agentes, los medicamentos y las composiciones farmacéuticas de la invención también se pueden administrar por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche para la piel. También se pueden administrar mediante vía ocular, en particular, para tratar enfermedades del ojo.

Para uso oftálmico, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede formular como suspensiones micronizadas en solución salina isotónica estéril con pH ajustado o, preferentemente, como soluciones en solución salina isotónica estéril con pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante, tal como cloruro de bencilalconio. De manera alternativa, se pueden formular en una pomada, tal como petrolato.

Para aplicar de manera tópica en la piel, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se puede formular como una pomada adecuada que contiene el agente activo suspendido o disuelto, por ejemplo, en una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, petróleo líquido, petrolato blanco, propilenglicol, agente de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulgente y agua. De manera alternativa, se pueden formular como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta, por ejemplo, en una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de cetilésteres, alcohol de cetearilo, 2-octildodecanol, alcohol de bencilo y agua.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen caramelos que comprenden el

ingrediente activo en una base saborizada, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un portador líquido adecuado.

5 Generalmente, en los seres humanos, la administración local del tratamiento combinado descrito en el presente documento en o cerca del sitio de un tumor es la vía de administración preferida, en particular, intratumoral o peritumoral.

10 Para uso en veterinaria, el tratamiento combinado descrito en el presente documento se administra 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 más apropiadas para un animal en particular.

Ejemplos

15 **Ejemplo 1 – información de secuencia**

Anticuerpo anti-CD40 clon G12 (anticuerpo ADC-1013)

20 (a) *secuencias de CDR (definidas de acuerdo con la numeración IMGT, con las secuencias de CDR principales allí subrayadas)*

| | | |
|----|--|----------------|
| | V _L CDR1: CTGSSSNIGAGYINVY | [SEQ ID NO:1]; |
| | V _L CDR2: <u>GNINRPS</u> | [SEQ ID NO:2]; |
| | V _L CDR3: <u>CAAWDKSISGLV</u> | [SEQ ID NO:3]; |
| 25 | V _H CDR1: <u>GFTFSTYGMH</u> | [SEQ ID NO:4]; |
| | V _H CDR2: <u>GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR</u> | [SEQ ID NO:5]; |
| | V _H CDR3: <u>CARILRGGSGMDL</u> | [SEQ ID NO:6] |

(b) *Secuencias de la región variable*

30 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable (V_L) – SEQ ID NO:7

35 QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYINVYQQLPGTAPKLLIYGNINRPSGVPDRFSGSKSGTSASL
AISGLRSEDEADYYCAAWDKSISGLVFGGGTKLTVLG

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable (V_H) – SEQ ID NO:8

40 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGRFTISRDN
SENALYLQMNSLRRAEDTAVYYCARILRGGSGMDLWGQGTLLTVSS

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable (V_L) – SEQ ID NO:9

45 CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTCTTGCCTGG
GAGCAGCTCCAACATCGGGGCGGGTTACAATGTATACTGGTATCAGCAGCTCCAGGAACGGCCCCAAAC
TCCTCATCTATGGTAACATCAATCGGCCCTCAGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCT
CAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCATGGGATAAG
AGCATTCTGGTCTGGTTTTCGGCGGAGGAACCAAGCTGACGGTCTAGGT

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable (V_H) – SEQ ID NO:10

50 GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAG
CCTCTGGATTACCTTCAGTACTTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
CTTTCATATATTAGTGGTGGTAGTAGTTACATTTTCTACGCAGACTCAGTGAGGGGCCGATTACCATCTCCA
GAGACAACCTCCGAGAACGCGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGATTAC
55 TGTGCGAGAATATTAAGAGGCGGGAGCGGTATGGACCTCTGGGGCCAAGGTACTGGTCACCGTGAGCTC
A

(c) *Ejemplos de secuencias de aminoácidos de la región constante*

60 Región C2 de la cadena ligera de Ig lambda humana (NCBI AAA59107.1) - SEQ ID NO:11

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSNKYAASSYLSLTPE
QWKSHRSYSQCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

65 Región constante de la cadena pesada de Ig gamma-1 humana (Uniprot P01857.1) - SEQ ID NO: 12

ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 5 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Secuencia de CD40 humana – SEQ ID NO: 13

>gi|117606560|gb|ABK41937.1| molécula de CD40, miembro 5 de la superfamilia del receptor de TNF [Homo sapiens]

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRE
 THCHQHXYCDPNLGLRVQKGTSETDICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPV
 GFFSNVSSAFEKCHPWTSCTEKDLVVQAGTNKTDVCGPQDRLRALVVIIFGILFAILLVLFIKKVAKKPTNKA
 10 PHPKQEPQEINFDDPLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

Ejemplo 2 – biodisponibilidad después de la administración local o sistémica

Se realizaron estudios preclínicos en *Macaca fascicularis*, y en ratones, a fin de estudiar la biodisponibilidad de ADC-1013 después de la administración peritumoral, intratumoral o intravenosa.

Materiales y métodos

La farmacocinética de ADC-1013 se evaluó en un modelo de ratón transgénico que expresa CD40 humana inoculado con células de cáncer de vejiga que no expresan CD40 humana, MB49. Se inyectó ADC-1013 por vía intratumoral (IT), peritumoral (PT) o intravenosa (IV) en una dosis de 100 µg, y el suero se recolectó antes del tratamiento y 4 y 24 h después del tratamiento. El perfil farmacocinético (Figura 1) indica que la exposición sistémica de ADC-1013, 4 horas después de la administración, se reduce de 100 a 1000 veces después de la administración IT o PT, en comparación con la administración IV.

Los monos *Macaca fascicularis* se expusieron a ADC-1013 a través de la vía subcutánea o intravenosa. Aquí la administración subcutánea es análoga a la administración local a un melanoma.

Resultados y conclusiones

Se extrajeron muestras de sangre de todos los animales para su análisis toxicocinético en los siguientes puntos temporales: Antes de la dosis, y 15 minutos, y 2, 6, 24, 48, 72, 96 y 168 horas después de la dosis y niveles de ADC1013 medidos (Figura 2). Se calculó la biodisponibilidad de ADC1013 después de la administración subcutánea, en función de la media del área debajo de la curva (AUC-96). La AUC-96 para administración subcutánea vs. administración intravenosa varió entre 28-42 %, lo que indicó 28 % - 42 % de biodisponibilidad sistémica.

Estas observaciones se aplicaron para decidir los niveles de dosis de combinaciones administradas de anticuerpos inmunoterapéuticos en el modelo de ratón B16.F10 descrito en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3 – modelo de melanoma murino in vivo

B16.F10 es la línea de células tumorales que se usa más frecuentemente como modelo para melanoma en modelos de ratón preclínicos (Grosso 2013 Cancer Immunity Review). La línea celular de melanoma B16.F10 de ratón es muy comparable con la de melanomas humanos, porque expresa MHC a niveles bajos y se considera poco inmunógena (Lechner J immunother 2013). Los niveles bajos de MHC pueden estar asociados, por ejemplo, a la activación insuficiente de linfocitos T, lo que podría hacer que esos tumores fueran más difíciles de tratar con inmunoterapia. A fin de aumentar la relevancia de B16.F10 para la traducción, la línea celular se transfectó con CD40 humana. La línea transfectada (denominada B16.F10(hCD40+) se usó para estos experimentos.

Materiales y métodos

La línea celular de melanoma B16.F10 se obtuvo de la American Type Cell Collection (ATCC). La línea que expresa hCD40, B16.F10(hCD40+), se obtuvo transfectando B16.F10 con un vector linearizado que contenía CD40 humana y usando Lipofectamine (Invitrogen). El vector contenía elementos que conferían resistencia a neomicina. Las células transfectadas se cultivaron en DMEM (que contenía 4,5 g/l de glucosa, ultraglutamina I y piruvato de sodio), 10 % de FCS, Hepes y 1 mg/ml de G418 para seleccionar los transfectantes estables. Los clones que expresan CD40 se seleccionaron usando biotina CD40 y microesferas magnéticas (Miltenyi). Se seleccionó un solo clon con expresión de hCD40 verificada, medida mediante citometría de flujo (clon 5.G12.46).

El B16.F10(hCD40+), que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho del ratón transgénico hCD40 (hCD40Tg) en un volumen de 100 µl. La cantidad inoculada promedio de células fue de 0,1 x 10⁶ por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se

calculó el volumen tumoral ($\frac{an}{2x} \frac{l}{2x} \frac{al}{2x} \pi \times (\frac{4}{3})$). Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Se administró ADC-1013 por vía intratumoral (20 μ l, 100 μ g por dosis), y anti-PD-1 (clon RPM1-14, BioXcell) por vía intraperitoneal (100 μ l, 250 μ g por dosis).

5 *Resultados y conclusiones*

La línea celular de melanoma B16.F10(hCD40+) transfectada mostró una expresión sustancial de CD40 humana, como se muestra en la Figura 3A. Los efectos antitumorales de ADC-1013 se determinaron en ratones hCD40tg que tenían melanoma B16.F10(hCD40+) subcutáneo en la supervivencia (Figura 4A) y en el volumen tumoral el día en que se sacrificó el primer ratón (Figura 4B). ADC-1013 mostró una reducción considerable del crecimiento tumoral medido por aumento del tiempo de supervivencia y reducción del volumen tumoral. La eficacia antitumoral aumentó tratando a los animales con una combinación de ADC-1013 y anticuerpo anti-PD-1.

15 **Ejemplo 4 – modelo de cáncer de vejiga murino in vivo**

Materiales y métodos

Se usaron células de cáncer de vejiga MB49 para iniciar los tumores en ratones hCD40Tg hembra de 8 semanas de vida. El día 0, se inocularon $0,25 \times 10^6$ células tumorales por vía subcutánea en el flanco derecho del ratón. El día 14, los ratones se inyectaron por vía intratumoral o intraperitoneal con un anticuerpo anti-CD40 de prueba (total de 1 μ g y 30 μ g de anticuerpo por ratón, o PBS; 4 ratones por grupo). El día 16, 40 ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Los ganglios linfáticos de drenaje tumoral se recolectaron en medio completo, y se agruparon dos tumores o ganglios linfáticos de cada grupo experimental. El tejido recolectado se homogeneizó enzimáticamente y mecánicamente usando Liberase TL (Roche) y filtros de red de nylon (100 μ m; Fischer Scientific). Las membranas se lavaron exhaustivamente con medio RPMI que contenía 3-10 mM de EDTA y 0,1 % de suero fetal de ternero para preparar suspensiones de células simples. Las células aisladas se lavaron en PBS que contenía 0,5 % de albúmina de suero bovino, y la fijación a Fc no específica se bloqueó tratando las células con anti-CD16/32 de ratón (BD Bioscience).

Los niveles de expresión de CD86 (como un marcador para la activación) se analizaron por separado en células que expresan Cd11c y en células que expresan Cd11b mediante citometría de flujo. CD11c es un marcador de células dendríticas. CD11b se expresa en monocitos, macrófagos y subconjuntos de células dendríticas. Las células se tiñeron con tinción de fijación Live/dead FVS450 (BD Bioscience) y anticuerpos específicos contra CD11c-PE, CD11b-PECy7 y CD86-APC (BD Bioscience) diluidos 1:100. Después de la tinción, todas las células se fijaron con paraformaldehído usando Cellfix (BD Bioscience). La tinción de cada muestra se midió y se calculó como CD86 (muestra)-FMO(muestra) y se presentó como % de células con expresión menos control de PBS. Las células teñidas se analizaron usando el *software* de análisis FACS Verse (Becton Dickinson) y FlowJo vX. Los resultados se muestran en las Figuras 5A (células CD11c) y 5B (células CD11b).

40 *Resultados y conclusiones*

Los datos en la Figura 5A muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 aumentó la activación de las células dendríticas medidas según la expresión de CD86 en el tumor. Los datos en la Figura 5B muestran que el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 aumentó la activación de células que expresan CD11b medidas según la expresión de CD86 en el tumor. En general, se obtiene una activación más fuerte después del tratamiento intratumoral (IT) que después del tratamiento intraperitoneal (IP). El tratamiento con una dosis baja de 1 μ g administrado por vía intratumoral (IT) generó una activación inesperadamente alta de las células dendríticas.

50 **Ejemplo 5 – efecto del tratamiento combinado I in vivo**

Materiales y métodos

La línea de células tumorales B16.F10(hCD40+), que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho del ratón transgénico hCD40 (hCD40Tg) en un volumen de 100 μ l. La cantidad de células inoculadas fue de $0,1 \times 10^6$ por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se calculó el volumen tumoral ($\frac{an}{2x} \frac{l}{2x} \frac{al}{2x} \pi \times (\frac{4}{3})$). Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Se administró ADC-1013 por vía intratumoral (100 μ g por dosis). Se inyectaron por vía intraperitoneal anticuerpo anti-PD-1, 250 μ g por dosis (Clon RPM1-14, BioXcell) y anticuerpo anti-CTLA-4, 100 μ g por dosis (9D9, BioXcel). El volumen tumoral el día 14 se muestra en la Figura 6.

60 *Resultados y conclusiones*

Se demostró que el tratamiento con un anticuerpo que se dirige a PD-1 en combinación con un anticuerpo que se dirige a CTLA-4 puede conferir efectos aditivos en ensayos clínicos (Wolchok et al New Eng J Med, 2013). En este ejemplo, se describen datos preclínicos que sugieren que la adición del tratamiento con ADC-1013 a la combinación CTLA-4/PD-1 podría aumentar aún más los efectos terapéuticos en los pacientes con melanoma. El efecto

antitumoral medido según una reducción del volumen tumoral el día 14 fue considerablemente mejor para CTLA-4, PD-1 y ADC-1013 en comparación con CTLA-4 y PD-1 solo (Figura 6).

5 En un entorno clínico, el anticuerpo CTLA-4 podría ser cualquiera de ipilimumab, tremelimumab u otros anticuerpos que se dirigen a CTLA-4. El anticuerpo que se dirige a PD-1 podría ser un anticuerpo que se fija a PD-1 humana, tal como nivolumab o pembrolizumab, u otros. También podría ser un anticuerpo que se fija a los ligandos de PD-1, tales como anticuerpos que se dirigen a PD-L1 y PD-L2, por ejemplo, durvalumab y avelumab.

10 **Ejemplo 6 – efecto del tratamiento combinado II in vivo**

Materiales y métodos

15 La línea de células tumorales B16.F10, que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho del ratón transgénico hCD40 (hCD40Tg) en un volumen de 100 µl. La cantidad de células inoculadas fue de $0,1 \times 10^6$ por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se calculó el volumen tumoral ($an/2x l/2x al/2x pi x (4/3)$). Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Los anticuerpos ADC-1013, anti-CD137 (clon Lob 12.3) y anti-OX40 (CD86) y los controles se administraron por vía intratumoral (100 µg por dosis). El volumen se controló con el paso del tiempo, como se muestra en la Figura 7

20 *Resultados y conclusiones*

El tratamiento con ADC-1013 generó una respuesta antitumoral considerable en comparación con el control. El efecto antitumoral fue mayor que el efecto antitumoral obtenido con anticuerpos que se dirigen a CD137 y OX40 (Figura 7). La combinación de ADC-1013 y OX40, así como la combinación de ADC-1013 con CD137, dio como resultado un mayor efecto antitumoral en comparación con las monoterapias. Esto indica que combinar CD40 y CD137 o combinar CD40 y OX40 tendrá beneficios clínicos.

30 **Ejemplo 7 – Efecto de ADC-1013 en melanoma B16 de tipo silvestre en ratones**

Materiales y métodos

Se inocularon por vía subcutánea células B16.F10.hCD40+ o células B16.F10 (wt) (1×10^5), y los ratones se trataron por vía intratumoral con ADC-1013 los días 3, 6 y 9 (100 µg por dosis).

35 Los ratones usados para este estudio fueron ratones hCD40tg.

Resultados y conclusiones

40 ADC-1013 generó efectos antitumorales considerables también en los tumores B16.F10. El efecto antitumoral obtenido en los tumores B16.F10 (wt) y B16.F10.hCD40+ fue similar (Figura 8). Esto no descarta que la inducción directa de ADCC cumpla una función importante en el tratamiento del melanoma que expresa CD40 humana. Puede ocurrir que haya otras diferencias cualitativas en los tumores que expresan hCD40, tales como menor infiltración de células inmunitarias. Además, los niveles de CD40 humana en los tumores B16 fueron bajos, según se midió *ex vivo* en muestras de tumores.

45 **Ejemplo 8 – Efecto de ADC-1013 en modelo de linfoma (A20)**

Materiales y métodos

50 La línea de células de linfoma A20, que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho de ratones hCD40tg-BalbC (F1) en un volumen de 100 µl. Los ratones hCD40tg-BalbC (F1) se generaron cruzando ratones hCD40tg con ratones BalbC. La cantidad de células inoculadas fue de 5×10^6 por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se calculó el volumen tumoral ($an/2x l/2x al/2x pi x (4/3)$). Se administró ADC-1013 (30 µg por dosis) por vía peritumoral los días 10, 13 y 16 en ratones con tumores de linfoma establecidos (A20).

Resultados y conclusiones

60 El tratamiento con ADC-1013 dio como resultado un efecto antitumoral considerable en el modelo de linfoma A20 (Figura 9). Este modelo no expresa hCD40, y entonces el efecto antitumoral aquí demostrado es causado solamente por la activación de las células inmunitarias mediante ADC-1013.

Ejemplo 9 - Efecto de ADC-1013 en modelo de cáncer de pulmón (LLC-1)

65 *Materiales y métodos*

La línea de células de cáncer de pulmón (LLC-1), que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho de ratones hCD40tg en un volumen de 100 µl. La cantidad de células inoculadas fue de $0,25 \times 10^6$ por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se calculó el volumen tumoral ($\frac{\pi}{6} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \pi \times \frac{4}{3}$). Se administró ADC-1013 (100 µg) por vía peritumoral los días 4, 7 y 10 en ratones hCD40tg con tumores establecidos (LLC-1).

Resultados y conclusiones

El tratamiento con ADC-1013 dio como resultado un efecto antitumoral considerable ($p < 0,05$, prueba t de Mann Whitney unilateral) en el modelo de cáncer de pulmón (Figura 10). Este modelo no expresa hCD40, y el efecto antitumoral demostrado aquí solo es causado por la activación de las células inmunitarias mediante ADC-1013.

Ejemplo 10 – Efecto distal de la administración local de ADC-1013

15 Materiales y métodos

La línea de células tumorales B16.F10, que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho y en el flanco izquierdo del ratón transgénico hCD40 (hCD40Tg) en un volumen de 100 µl. La cantidad de células inoculadas fue de $0,1 \times 10^6$ por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se calculó el volumen tumoral ($\frac{\pi}{6} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \pi \times \frac{4}{3}$). Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Se administraron ADC-1013 y los controles por vía intratumoral (100 µg por dosis) en el tumor en el flanco derecho. El volumen tumoral del tumor inyectado y del no inyectado se controló con el tiempo, como se muestra en la Figura 11.

25 Resultados y conclusiones

El tratamiento local intratumoral también generó efectos antitumorales en el tumor distal no inyectado. Los niveles de ADC-1013 libre después del tratamiento con dosis de 100 µg están muy por debajo de la EC50 para ADC-1013 en los ensayos *in vitro*, lo que sugiere que el efecto antitumoral en el tumor no inyectado depende, en parte, de la migración de células inmunitarias que se activan en el área del tumor inyectado, al tumor no inyectado.

Esto sugiere que ADC-1013 inyectado en un tumor puede tener efectos antitumorales considerables en otros tumores no inyectados (por ejemplo, metástasis).

35 Ejemplo 11 – Efecto de la administración sistémica (iv) de ADC-1013

Materiales y métodos

La línea de células tumorales B16.F10(hCD40+), que crece en fase log, se inyectó por vía subcutánea el día 0 (D0) en el flanco derecho del ratón transgénico hCD40 (hCD40Tg) en un volumen de 100 µl. La cantidad de células inoculadas fue de $0,1 \times 10^6$ por ratón. El crecimiento tumoral se midió con un calibre digital en ancho, longitud y altura, con lo cual se calculó el volumen tumoral ($\frac{\pi}{6} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \pi \times \frac{4}{3}$). Los tratamientos se administraron los días 3, 6 y 9. Se administró ADC-1013 por vía intravenosa (100 µg por dosis).

45 Resultados y conclusiones

La administración sistémica intravenosa de ADC-1013 dio como resultado un efecto inhibitor pronunciado en el crecimiento tumoral (Figura 12).

50 Ejemplo 12 – Efecto del tratamiento combinado III *in vivo*

Materiales y métodos

Los ratones BalbC hembra se inocularon por vía subcutánea con 5×10^6 células de linfoma A20. Los ratones se trataron con 9D9 (anticuerpo anti-CTLA-4, BioXcel) por vía peritumoral los días 5 y 8, y con el agonista de TLR, CpG (1668) por vía intratumoral los días 5, 8 y 11. La supervivencia se controló con el tiempo.

Resultados y conclusiones

El anticuerpo 9D9 se dirige al receptor de puntos de control de CTLA-4 y CpG se fija al receptor de tipo Toll 9. Los TLR son proteínas de transmembrana, expresadas en células presentadoras de antígenos, tales como células dendríticas. La ligadura de TLR9 con CpG induce la activación de células dendríticas. Los resultados se muestran en la Figura 13.

El efecto antitumoral de la combinación de tratamientos que se dirigen a TLR9 y CTLA4 no da como resultado un aumento del efecto antitumoral en comparación con el tratamiento con CpG solo. Por ende, los datos muestran que

una combinación de un tratamiento que activa las células dendríticas en combinación con un inhibidor de los puntos de control no siempre da como resultado un aumento de los efectos antitumorales.

5 En consecuencia, la eficacia de los tratamientos combinados de la presente invención no podría haberse previsto ni esperado razonablemente.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Alligator Bioscience AB

<120> Anticuerpos

<150> GB1414270.7

15 <151> 12-08-2014

<150> GB1422614.6

<151> 18-12-2014

20 <150> GB1507541.9 [01/05/2015]

<151> 01-05-2015

<160> 13

25 <170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región determinante de la complementariedad de la cadena ligera variable 1

<400> 1

35

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Cys | Thr | Gly | Ser | Ser | Ser | Asn | Ile | Gly | Ala | Gly | Tyr | Asn | Val | Tyr |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 |

<210> 2

<211> 7

40 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región determinante de la complementariedad de la cadena ligera variable 2

45 <400> 2

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Gly | Asn | Ile | Asn | Arg | Pro | Ser |
| 1 | | | | 5 | | |

50 <210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Región determinante de la complementariedad de la cadena ligera variable 3

<400> 3

60

| | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Cys | Ala | Ala | Trp | Asp | Lys | Ser | Ile | Ser | Gly | Leu | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |

<210> 4

ES 2 725 463 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena pesada variable 1

<400> 4

10 Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Met His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena pesada variable 2

20 <400> 5

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ser Tyr Ile Ser Gly Gly Ser Ser Tyr
 1 5 10 15
 Ile Phe Tyr Ala Asp Ser Val Arg Gly Arg
 20 25

25 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Región determinante de la complementariedad de la cadena pesada variable 3

<400> 6

35 Cys Ala Arg Ile Leu Arg Gly Gly Ser Gly Met Asp Leu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera variable

45 <400> 7

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

ES 2 725 463 T3

5 <210> 8
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada variable

10 <400> 8

```

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

15 <210> 9
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..336
 <223> /mol_type="ADN no asignado"
 /nota = "Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable"
 /organismo = "Secuencia artificial"

25 <400> 9

```

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc cggggcagag ggtcaccatc      60
tcttgcaactg ggagcagctc caacatcggg gcggggtaca atgtatactg gtatcagcag      120
ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatggttaaca tcaatcggcc ctcaggggctc      180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccttggccat cagtgggctc      240
cggtcogagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg ataagagcat ttctggctctg      300
gttttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt      336
  
```

30 <210> 10
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..357
 <223> /mol_type="ADN no asignado"
 /nota = "Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable"
 /organismo = "Secuencia artificial"

40

ES 2 725 463 T3

<400> 10

```

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acttatggca tgcaactgggt cgcaccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg gctttcatat attagtgggt gtagtagtta cattttctac      180
gcagactcag tgagggggccg attcaccatc tocagagaca actccgagaa cgcgctgtat      240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaatatta      300
agaggcggga gcggtatgga cctctggggc caaggtacac tggtcaccgt gagctca      357

```

5

<210> 11

<211> 105

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Región C2 de la cadena ligera lambda de Ig humana

15

<400> 11

```

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

```

<210> 12

20 <211> 330

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <223> Región constante de la cadena pesada de Ig gamma-1 humana

<400> 12

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

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

5 <210> 13
<211> 277
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Secuencia de CD40 humana

<400> 13

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

275

REIVINDICACIONES

1. Un kit de tratamiento combinado para tratar un tumor sólido en un sujeto, que comprende (a) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se fija específicamente a CD40, y (b) un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se fija específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|---|------------------|
| V _L CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY | [SEQ ID NO:1]; |
| V _L CDR2: GNINRPS | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: CAAWDKSIISGLV | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDR1: GFTFSTYGMH | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR | [SEQ ID NO:5]; y |
| V _H CDR3: CARILRGGSGMDL | [SEQ ID NO:6], |

10 y en donde el agente inmunoterapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1.

2. El kit de tratamiento combinado de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor sólido se selecciona de los grupos que consisten en un adenoma, un blastoma, un carcinoma, un tumor desmoide, un tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, un tumor endocrino, un tumor de células germinales, un linfoma, un sarcoma, un tumor de Wilms, un tumor pulmonar, un tumor de colon, un tumor linfático, un tumor mamario y un melanoma.

3. Un kit de tratamiento combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo que se fija específicamente a CD40, comprende o consiste en un anticuerpo intacto.

4. Un kit de tratamiento combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se fija específicamente a CD40 comprende o consiste en un fragmento de fijación al antígeno seleccionado del grupo que consiste en: un fragmento Fv y un fragmento tipo Fab.

5. Un uso del kit de tratamiento combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, es humano o humanizado.

6. Un kit de tratamiento combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se fija específicamente a CD40 comprende

- (a) la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 y/o la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 8;
- (b) la región constante de la cadena ligera de SEQ ID NO: 11 y/o la región constante de la cadena pesada de SEQ ID NO: 12; o
- (c) la cadena ligera de SEQ ID NO: 7 más SEQ ID NO:11 y/o la cadena pesada de SEQ ID NO: 8 más SEQ ID NO:12.

7. Un kit de tratamiento combinado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo anti-PD-1 se selecciona del grupo que consiste en Nivolumab, Pembrolizumab, Lambrolizumab y Pidilizumab.

8. Un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se fija específicamente a CD40 para usar en un método para tratar un tumor sólido, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se fija específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|---|------------------|
| V _L CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY | [SEQ ID NO:1]; |
| V _L CDR2: GNINRPS | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: CAAWDKSIISGLV | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDR1: GFTFSTYGMH | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR | [SEQ ID NO:5]; y |
| V _H CDR3: CARILRGGSGMDL | [SEQ ID NO:6], |

9. Una composición farmacéutica que comprende (a) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se une específicamente a CD40 se usa en combinación con un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer, agente que es un anticuerpo anti-PD-1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1.

9. Una composición farmacéutica que comprende (a) un anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, que se une específicamente a CD40, y (b) un agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento de

cáncer, agente que es un anticuerpo anti-PD1 que bloquea la interacción entre PD1 y PD-L1, en donde el anticuerpo o la porción de fijación de este que se une específicamente a CD40 comprende las siguientes CDR

| | |
|---|------------------|
| V _L CDR1: CTGSSSNIGAGYNVY | [SEQ ID NO:1]; |
| V _L CDR2: GNINRPS | [SEQ ID NO:2]; |
| V _L CDR3: CAAWDKSIISGLV | [SEQ ID NO:3]; |
| V _H CDR1: GFTFSTYGMH | [SEQ ID NO:4]; |
| V _H CDR2: GKGLEWLSYISGGSSYIFYADSVRGR | [SEQ ID NO:5]; y |
| V _H CDR3: CARILRGGSGMDL | [SEQ ID NO:6], |

5 10. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el anticuerpo, o la porción de fijación al antígeno del mismo, es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.

11. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, en donde el agente inmunoterapéutico adicional con eficacia en el tratamiento del cáncer es como se definió en la reivindicación 7.

10

FIGURA 1

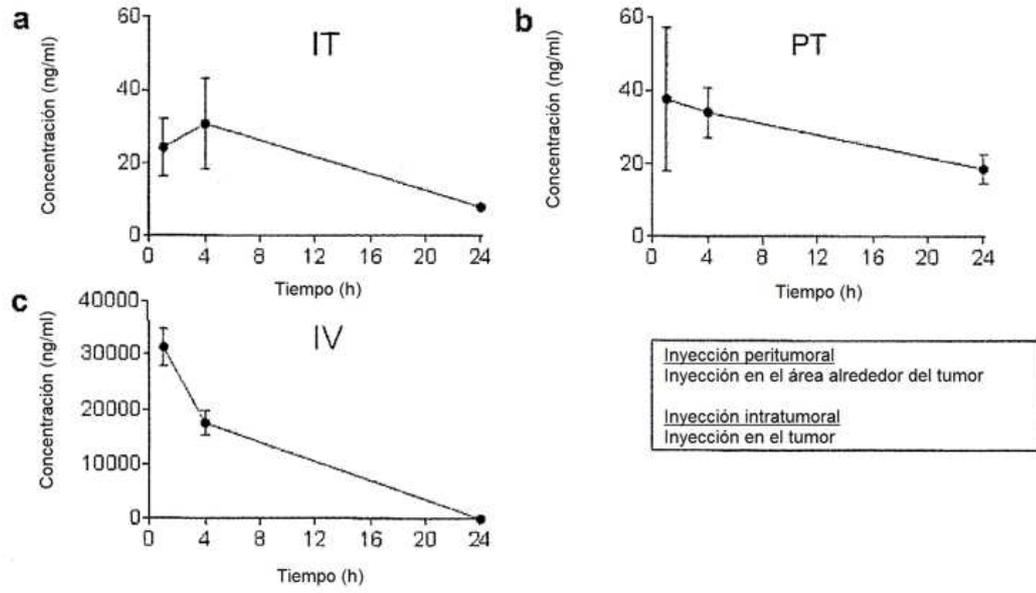


FIGURA 2

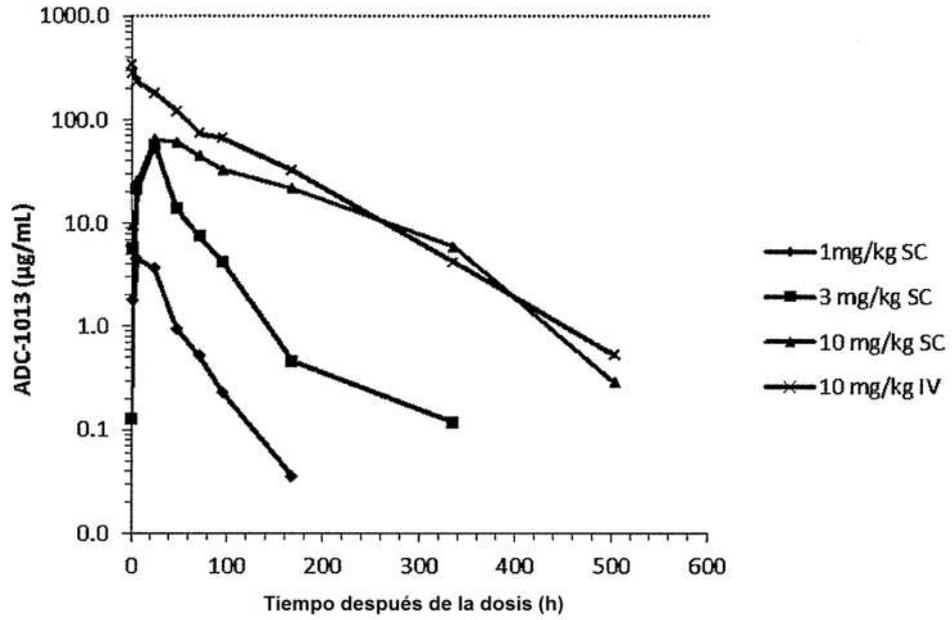
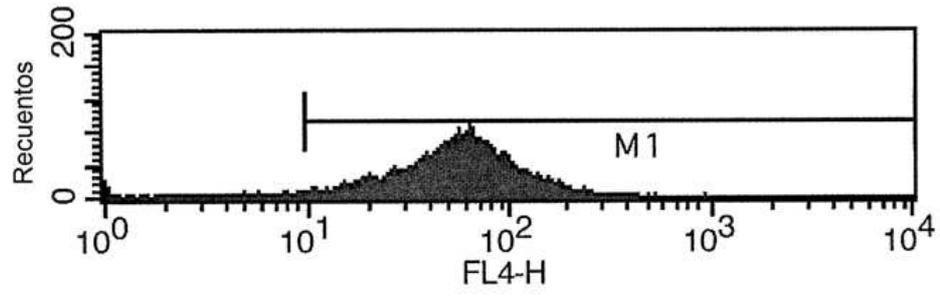


FIGURA 3

A



B

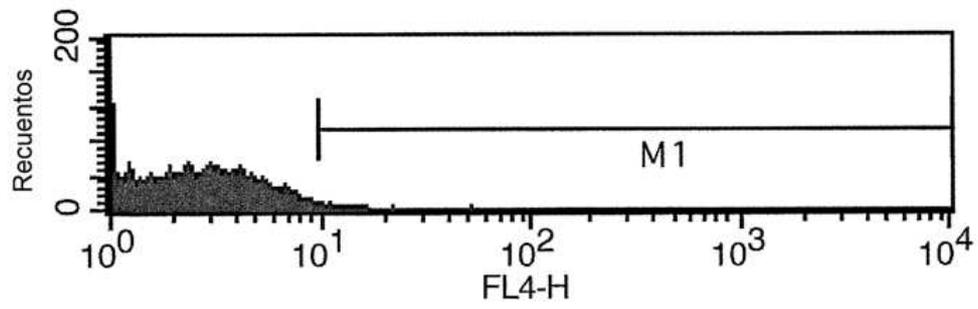


FIGURA 4

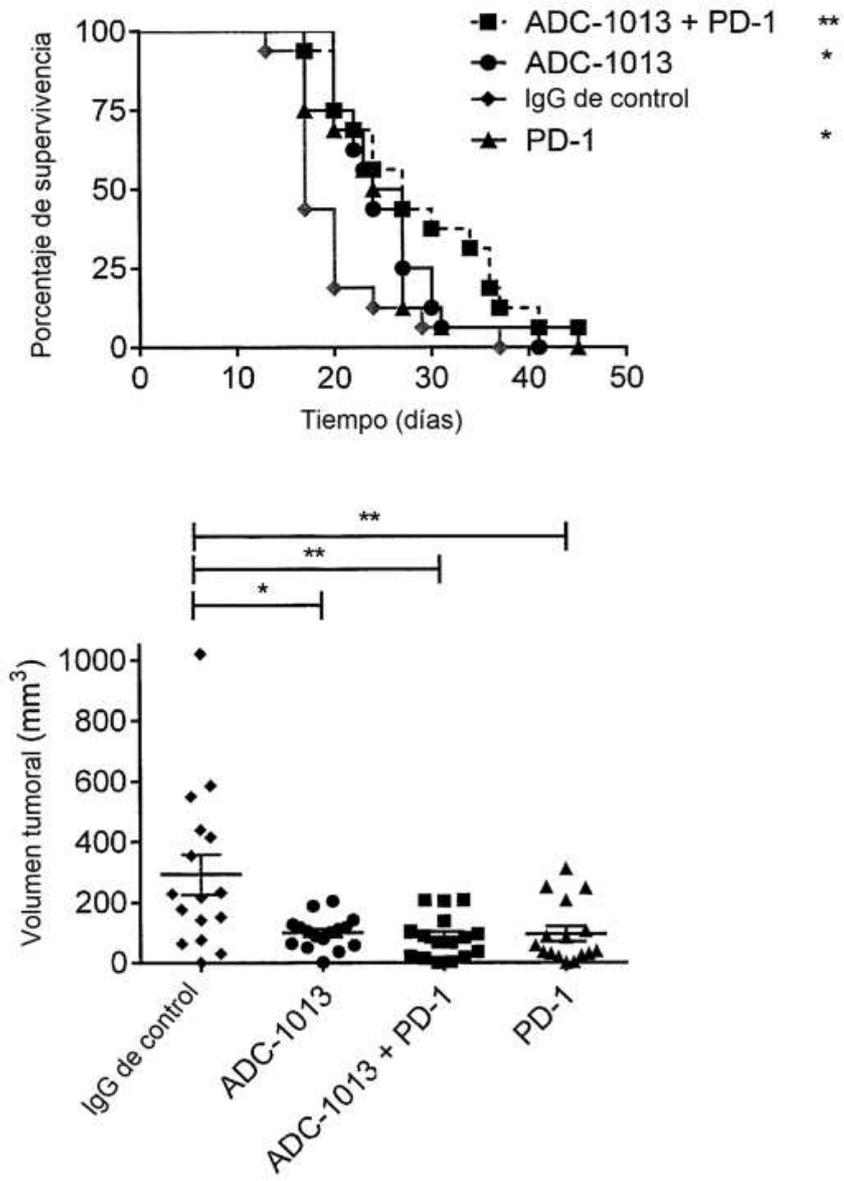


FIGURA 5A

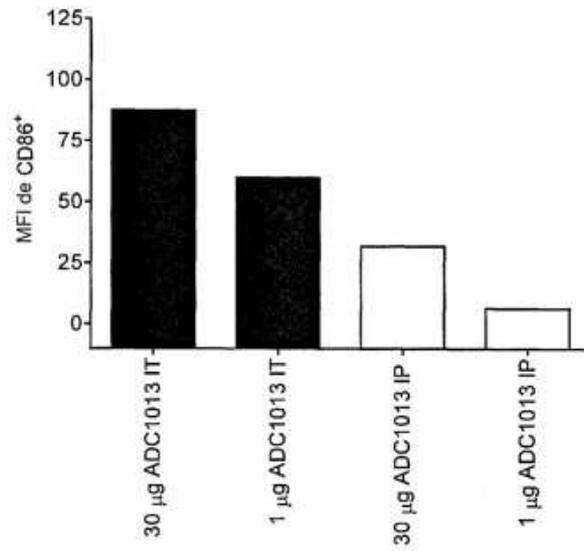


FIGURA 5B

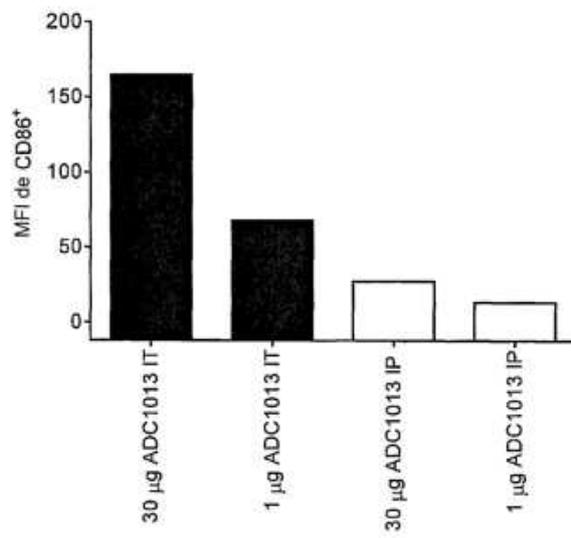


FIGURA 6

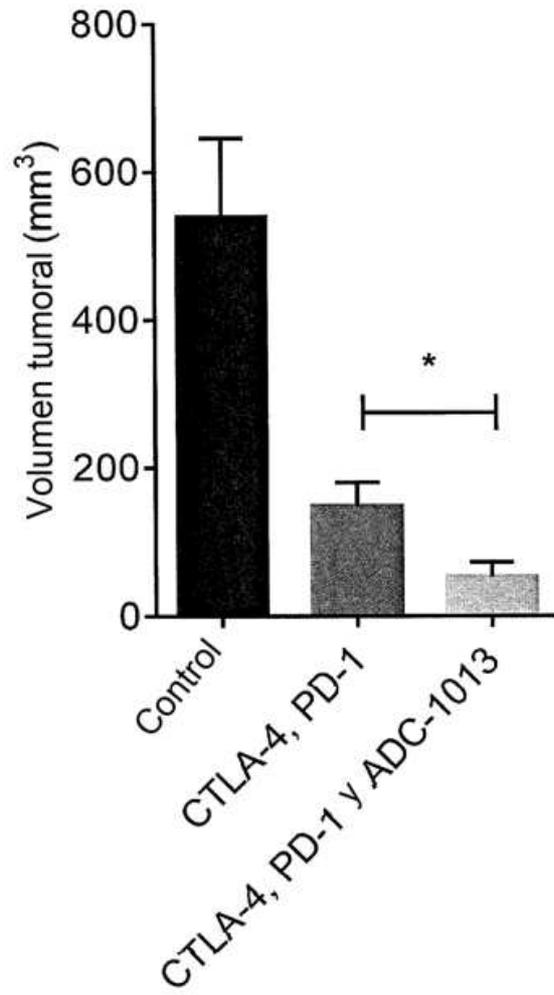


FIGURA 7

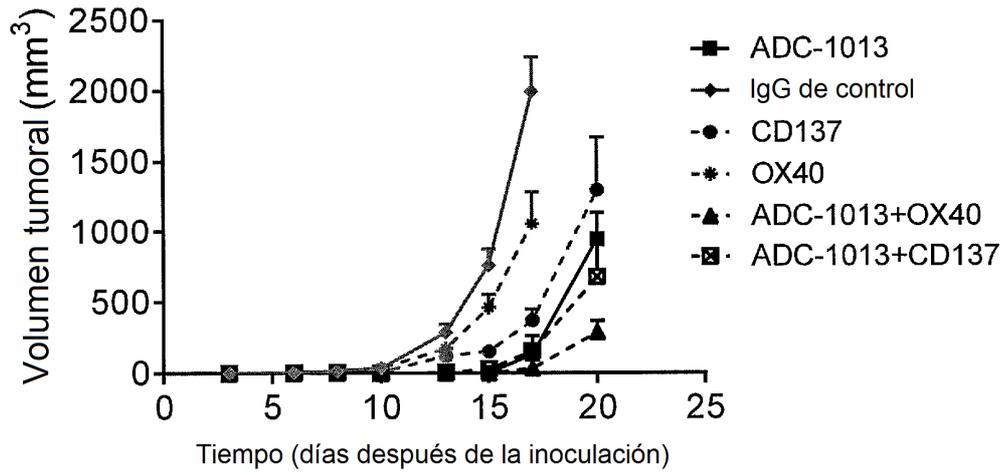


FIGURA 8

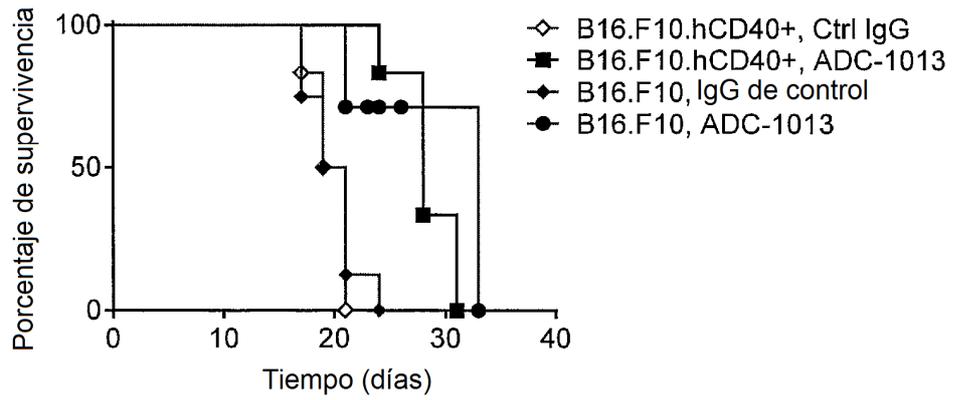
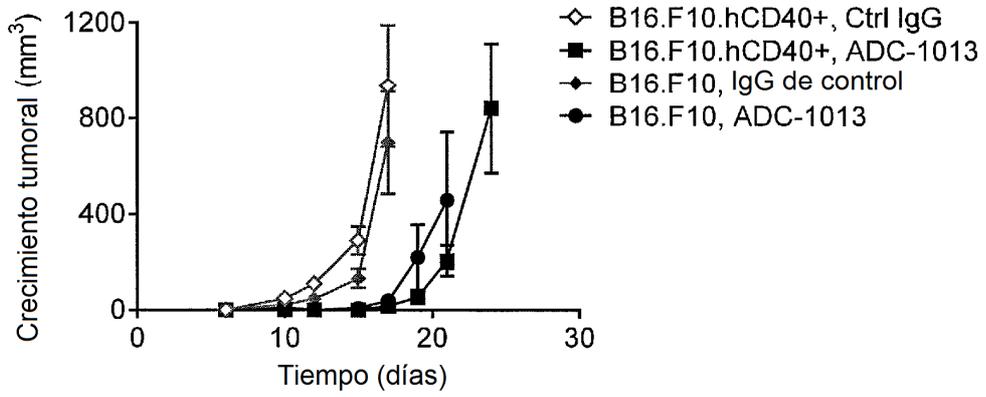


FIGURA 9

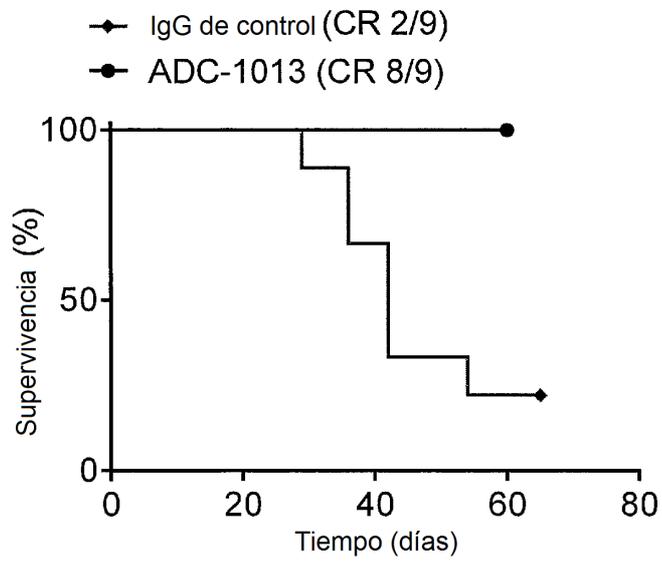
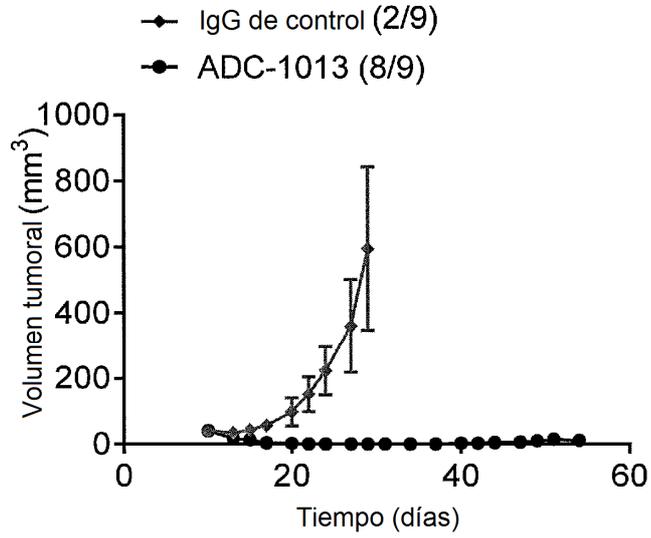


FIGURA 10

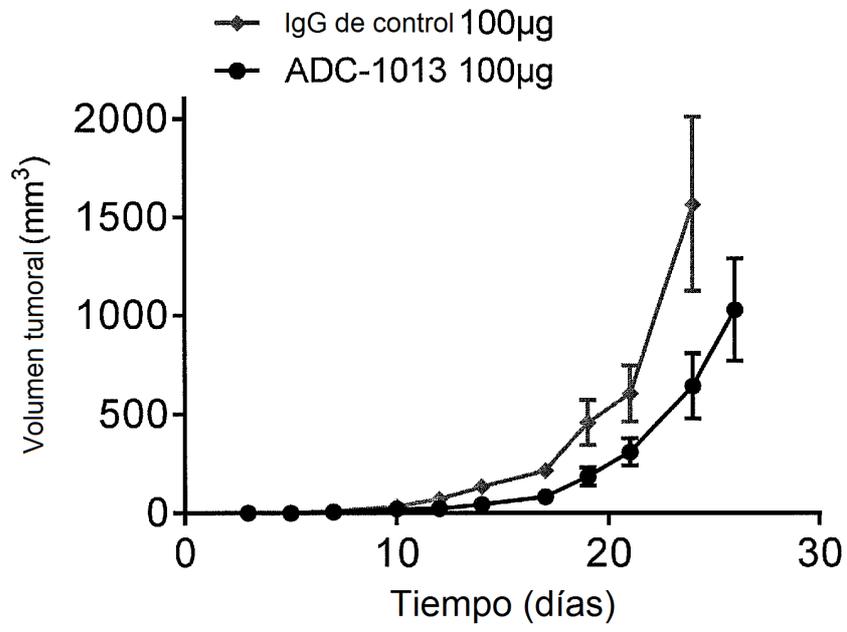


FIGURA 11

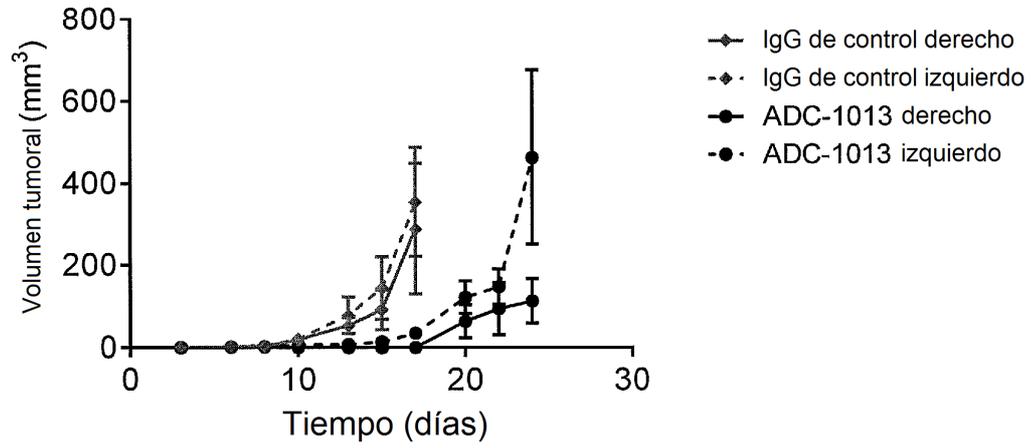


FIGURA 12

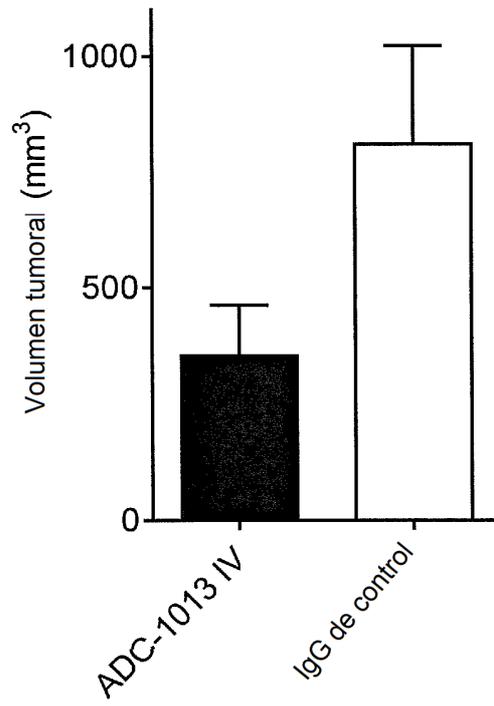


FIGURA 13

