



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0618217-8 A2



* B R P I 0 6 1 8 2 1 7 A 2 *

(22) Data de Depósito: 01/11/2006
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

(51) Int.CI.:
C07K 16/28 2006.01
A61K 39/395 2006.01
C12N 15/11 2006.01

(54) Título: USOS DE ANTICORPOS ANTI-CD40

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2005 US 60/732.580

(73) Titular(es): Novartis AG, Xoma Technology Ltd.

(72) Inventor(es): Mohammad Luqman, Sharon Lea Aukerman

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006042601 de 01/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/053661 de 10/05/2007

(57) Resumo: USOS DE ANTICORPOS ANTI-CD40Métodos para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 são fornecidos, em que o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo v/F ou F/F) também são fornecidos métodos de inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano que é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo v/F ou F/F). Os métodos compreendendo a administração ao paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Métodos e kits para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que é tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é não responsivo ou refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), bem como métodos e kits para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que é não responsivo ou refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), também são fornecidos. Os métodos da presente invenção têm uso no tratamento de doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas a células que expressam CD40. Esses métodos são particularmente vantajosos com relação a doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas a células que expressam tanto CD40 quanto CD20, uma vez que os métodos permitem o tratamento de pacientes que têm doença inflamatória ou autoimunes que é não responsivo ou refratário à terapia com outros agentes terapêuticos como anticorpos anti-CD20.

Pf 0618214-8

Ref - 020080091938 1/128

Data - 01/04/08

USOS DE ANTICORPOS ANTI-CD40

Esta invenção relaciona-se a novos usos de anticorpos anti-CD40, em particular no tratamento de doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas com 5 células que expressam CD40.

Fundamento da invenção

Vários membros da família de fator de necrose tumoral (TNF) de ligantes e seus receptores correspondentes regulam o crescimento de células normais por indução de apoptose ou 10 aumento da sobrevivência e proliferação celulares. É esse equilíbrio entre sinais apoptóticos e sinais de sobrevivência e proliferação que mantém a homeostasia celular normal. Pelo menos 26 receptores da família de TNF e 18 ligantes da família de TNF foram identificados até 15 hoje. As formas biologicamente ativas de ambos os receptores e ligantes são trímeros de proteínas automontadas. Transmembrana e formas solúveis dos receptores e ligantes foram identificadas. Embora os domínios intracelulares dos receptores não partilhem homologia de 20 seqüência, seus domínios extracelulares compreendem 40 repetições de aminoácidos, ricas em cisteína. Seus sinais de tails citoplasmáticos por interação com grupos dióis principais de proteínas intracelulares: fatores associados a receptor de TNF (TRAFs) e proteínas que contêm domínios 25 de morte (DD). A interação entre pelo menos seis TRAFs humanos e sítios de ligação de TRAF no tail citoplasmático de alguns desses receptores inicia várias vias de sinalização, que incluem AKT (a serina/treonina quinase referida como proteína quinase B ou PKB), fator-KB nuclear 30 (NF-KB), e proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPK).

Veja, por exemplo, a revisão por Younes e Kadin (2003) J Clin. Oncol. 18:3526-3534.

O membro de receptor da família de TNF CD40 é um antígeno de superfície celular de 50-55 kDa presente na superfície de células B humanas normais e neoplásicas, células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T CD8+, células endoteliais, e células monocíticas e epiteliais. O antígeno CD40 é também expresso em células T ativadas, plaquetas ativadas, células de músculo liso vascular inflamadas, eosinófilos, membranas sinoviais em artrite reumatóide, fibroblastos dérmicos, e outros tipos de células não linfóides. Dependendo do tipo de célula que expressa CD40, a ligação pode induzir adesão intercelular, diferenciação, ativação e proliferação. Por exemplo, a ligação de CD40 a seu ligante cognato, CD40L (também designado CD154), estimula a proliferação de células B e diferenciação nas células do plasma, produção de anticorpo, troca de isotipo, e geração de memória de célula B. Durante a diferenciação da célula B, CD40 é expresso em pré-células B, mas se perde com a diferenciação e células plasmáticas.

O ligante CD40 (CD40L), também conhecido como CD154, é uma proteína de transmembrana de 32-33 kDa que também existe em duas formas solúveis menores biologicamente ativas, de 18 kDa e 31 kDa, respectivamente (Graf e cols. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749- 1754; Mazzei e cols. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle e cols. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:5965-5967). CD40L é expresso em células T-helper CD4+ ativadas, mas não em repouso (Lane e cols. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2573-2578; Spriggs e cols. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1543-1550; and Roy e cols. (1993)

J. Immunol. 151:1-14). Tanto CD40 quanto CD40L foram clonados e caracterizados (Stamenkovi e cols. (1989) EMBO J. 8:1403-1410; Armitage e cols. (1992) Nature 357:80-82; Lederman e cols. (1992) J. Exp. Med. 175:1091-1101; e Hollenbaugh e cols. (1992) EMBO J. 11:4313-4321). Veja também Patente U.S. No. 5.945.513, que descreve CD40L humano. Células transfectadas com o gene de CD40L e que expressam a proteína de CD40L em sua superfície podem despertar a proliferação de células B, e, junto com outros 10 sinais estimulatórios, podem induzir a produção de anticorpo (Armitage e cols. (1992) supra; e Patente U.S. No. 5.945.513). Pacientes com doença autoimune têm níveis séricos elevados de CD40L solúvel (sCD40L) que não são observados em indivíduos saudáveis. A superexpressão de 15 CD40L causa doenças autoimunes similares ao lupus eritematoso disseminado em modelos de roedor (Higuchi e cols. (2002) J. Immunol. 168:9-12). Em contraste, a ausência de CD40L funcional rm células T ativadas causa síndrome de hiper-IgM ligada a X (Allen e cols. (1993) Science 259:990; e Korthauer e cols. (1993) Nature 361:539). Além disso, o bloqueio da interação de CD40/CD40L pode evitar a rejeição de transplantes em modelos de primatas não humanos. Veja, por exemplo, Wee e cols. (1992) Transplantation 53:501-7.

25 A expressão de CD40 em APCs tem um importante papel co-estimulante na ativação dessas células. Por exemplo, anticorpos monoclonais anti-CD40 agonísticos (mAbs) mostraram imitar os efeitos de células T helper na ativação de células B. Quando apresentados em células aderentes que 30 expressam FcγRII, esses anticorpos induzem a proliferação

de células B (Banchereau e cols. (1989) *Science* 251:70). Além disso, mAbs anti-CD40 agonísticos podem substituir o sinal de T helper para secreção de IgM, IgG e IgE na presença de IL-4 (Gascan e cols. (1991) *J. Immunol.* 147:8). 5 Além disso, mAbs anti-CD40 agonísticos podem evitar morte célula programada (apoptose) de células B isoladas de linfonodos.

Essas e outras observações sustentam a atual teoria de que a interação de CD40 e CD40L tem um papel importante na 10 regulação das respostas imunes humorais e mediada por células. Estudos mais recentes revelaram um papel muito mais amplo da interação CD40/CD40L em diversos processos fisiológicos e patológicos.

A via de transdução do sinal de CD40 depende da 15 regulação coordenada de vários fatores intracelulares. Assim como outros membros da família de receptor de TNF, CD40 ativa TRAFs, incluindo TRAF-2, -3, -5 e -6, que supra-regulam diversas vias de sinalização após encaixe de CD40 com CD40L (seja CD40L ligado a membrana ou CD40L solúvel), 20 incluindo quinase regulada por sinal extracelular (ERK), c-jun amino terminal quinase (JNK), p38 MAPK e NF-KB (veja, por exemplo, Younes e Carbone (1999) *Int. J. Biol. Markers* 14:135-143; van Kooten and Banchereau (2000) *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17).

25 A sinalização via CD40 mostrou evitar a morte celular por apoptose (Makus e cols. (2002) *J. Immunol.* 14:973-982). Os sinais apoptóticos são necessários para induzir a morte celular programada em uma maneira coordenada. Os sinais de morte celular podem incluir estímulos intrínsecos da célula 30 como estresse de retículo endoplasmático ou estímulos

extrínsecos como ligação de receptor de FasL ou TNF α . A via de sinalização é complexa, envolvendo a ativação de caspases como Caspase-3 e Caspase-9, e de poli (ADP ribose) polimerase (PARP). Durante a cascata, proteínas de sinalização anti-apoptose, como mcl-1 e bcl-x, e membros da família IAP de proteínas, como Inibidor de Apoptose Ligado a X (XIAP), são infra-regulados (Budihardjo e cols. (1999) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15:269-290). Por exemplo, em células dendríticas, a sinalização de célula CD40 pode bloquear os sinais de apoptose transduzidos por FasL (Bjorck e cols. (1997) Intl. Immunol. 9:365-372).

Portanto, o encaixe de CD40 por CD40L e a subsequente ativação da sinalização de CD40 são etapas necessárias para respostas imunes normais; no entanto, a desregulação da sinalização de CD40 pode levar à doença. A via de sinalização de CD40 está envolvida em doença autoimune (Ichikawa e cols. (2002) J. Immunol. 169:2781-2787 e Moore e cols. (2002) J. Autoimmun. 19:139-145). Adicionalmente, a interação CD40/CD40L tem um papel importante nos processos inflamatórios. Por exemplo, tanto CD40 quanto CD40L são superexpressos em lesões de aterosclerose humana e experimental. O estímulo de CD40 induz a expressão de enzimas que degradam matriz e expressão de fator tecidual em tipos de célula associadas à ateroma, como células endoteliais, células de músculo liso, e macrófagos. Além disso, a estimulação de CD40诱导 a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e IL-8, e adesão de moléculas como ICAM-1, E-seletina e VCAM. A inibição de interação CD40/CD40L evita a aterogênese em modelos animais. Em modelos de transplante, o bloqueio da interação

CD40/CD40L evita a inflamação. Constatou-se que a ligação CD40/CD40L age de forma sinérgica com o peptídeo beta amilóide de Alzheimer para promover a ativação da microglia, assim levando à neurotoxicidade.

5 Em pacientes com artrite reumatóide (AR), a expressão de CD40 é aumentada em condrótipos articulares; assim, a sinalização de CD40 contribuiu para a produção de citocinas danosas e metaloproteinases de matriz. Veja Gotoh e cols. (2004) *J. Rheumatol.* 31:1506-1512. Além disso, constatou-se
10 que a amplificação da resposta inflamatória sinovial ocorre através da ativação de MAPKs e NF-κB via ligação de CD40 em células sinoviais CD14+ de pacientes com AR (Harigai e cols. (2004) *Arthritis. Rheum.* 50:2167-2177). Em um modelo experimental de AR, o tratamento com anticorpo anti-CD40L
15 evitou a indução de doença, inflamação das articulações, e produção de anticorpo anti-colágeno (Durie e cols. (1993) *Science* 261:1328-1330). Finalmente, em experimentos clínicos, mostrou-se que o esgotamento de células B CD20+ positivas de pacientes com AR por administração de Rituxan®
20 (geralmente indicada para linfoma de células B) melhora os sintomas (Shaw e cols. (2003) *Ann. Rheum. Dis.* 62(Suppl. 2):ii55-ii59).

O bloqueio das interações de CD40/CD40L durante a apresentação de antígeno para células T também mostrou
25 induzir a tolerância a células T. Portanto, o bloqueio da interação CD40/CD40L evita a ativação inicial de célula T bem como induz a tolerância de longa duração à re-exposição ao antígeno.

Anticorpos monoclonais humanos anti-CD40 e inúmeros
30 usos destes são revelados em Pedidos de Patentes de co-

propriedade publicados como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 e WO 2005/044294. Aqueles pedidos revelam especificamente um anticorpo monoclonal anti-CD40 IgG1 humano, designado como CHIR-12.12, que foi gerado por imunização de camundongos transgênicos que sustentam o lócus de cadeia pesada de IgG1 humana e o lócus de cadeia leve x humana (XenoCamundongo® technology; Abgenix, California).

Como mostrado por análise FACS, CHIR-12.12 se liga especificamente a CD40 humano e pode evitar ligação CD40-ligante (CD40L). CHIR-12.12 pode competir (compete off) CD40L pré-ligado a CD40 de superfície celular. O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 é um forte antagonista e inibe proliferação *in vitro* mediada por CD40L de células B normais e malignas. O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 inibe diretamente a sobrevivência e as vias de sinalização mediadas por CD40L em linfócitos B humanos normais. *In vitro*, CHIR-12.12 mata células cancerosas primárias de pacientes com NHL (linfoma não Hodgkin) por ADCC. A atividade antitumor dose-dependente foi observada em um modelo de linfoma humano de xenoenxerto. CHIR-12.12 está atualmente em experimentos de fase I para malignidades de célula B.

CD20 é um antígeno de superfície celular expresso precocemente em diferenciação de célula B e permanece na superfície celular através do desenvolvimento da célula B. CD20 está envolvido na ativação de célula B, é expresso em níveis muito altos em células B neoplásicas, e é um alvo terapêutico clinicamente reconhecido (veja, por exemplo,

Hooijberg e cols. (1995) *Cancer Research* 55: 2627). Anticorpos que visam CD20, como rituximab (Rituxan®), foram aprovados pela "U.S. Food and Drug Administração" para o tratamento de linfoma não Hodgkin (veja, por exemplo, Boye 5 e cols. (2003) *Ann. Oncol.* 14:520). Rituxan provou ser um tratamento eficaz para linfoma não Hodgkin (NHL) de grau baixo, intermediário e alto (veja, por exemplo, Maloney e cols. (1994) *Blood* 84:2457-2466), McLaughlin e cols. (1998) *J. Clin. Oncol.* 16:2825-2833, Maloney e cols. (1997) *Blood* 10 90:2188-2195, Hainsworth e cols. (2000) *Blood* 95:30523056, Colombat e cols. (2001) *Blood* 97:101-106, Coiffier e cols. (1998) *Blood* 92:19271932), Foran e cols. (2000) *J. Clin. Oncol.* 18:317-324, Anderson e cols. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25:705-708, ou Vose e cols. (1999) *Ann. Oncol.* 15 10:58a). Rituxan® também consome células B normais, o que pode ter um papel das doenças inflamatórias e autoimunes. Ele está em experimento clínico para doenças autoimunes.

Embora o mecanismo exato de ação não seja conhecido, a evidência indica que os efeitos antilinfoma de Rituxan® são 20 em parte devidos à citotoxicidade mediada por complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), inibição de proliferação celular, e finalmente indução direta de apoptose. Alguns pacientes, no entanto, tornam-se resistentes ao tratamento com Rituxan® (veja Witzig e cols. (2002) *J Clin. Oncol.* 20:3262, Grillo-Lopez 25 e cols. (1998) *J Clin. Oncol.* 16:2825, ou Jazirehi e cols. (2003) *Mol. Cancer Ther.* 2:1183-1193). Por exemplo, alguns pacientes perdem expressão de CD20 em células B malignas após terapia com anticorpo anti-CD20 (Davis e cols. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:611). Além disso, 30% a 50% dos 30

pacientes com NHL de baixo grau não exibem resposta clínica a esse anticorpo monoclonal (Hainsworth e cols. (2000) *Blood* 95:3052-3056; Colombat e cols. (2001) *Blood* 97:101-106). A atividade clínica de rituximab em NHL também 5 mostrou ser correlacionada com o genótipo de Fc γ RIIIa do paciente. Pacientes com o polimorfismo 158aa de Fc γ RIIIa de V/V ou V/F são mais responsivos a rituximab que aqueles com F/F (por exemplo, veja, Cartron e cols. (2002) *Blood* 99(3):754-758 ou Dall'Ozzo e cols. (2004) *Cancer Res.* 10 64:4664-4669). Para pacientes que desenvolvem resistência a esse anticorpo monoclonal, ou que têm uma doença inflamatória ou doença autoimune que é resistente à terapia inicial com esse anticorpo, formas alternativas de intervenção terapêutica são necessárias.

* 15 Além disso, Rituxan® consome células B normais em pacientes. Portanto, ele pode ser usado para tratar doenças autoimunes e inflamatórias dependentes de células B.

Há, portanto, uma necessidade continuada por novos agentes terapêuticos e novas estratégias terapêuticas para 20 doenças inflamatórias e doenças autoimunes. Em particular, há uma necessidade por novas estratégias terapêuticas para o tratamento de pacientes refratário ao tratamento com anticorpos anti-CD20, como rituximab (Rituxan®).

Breve sumário da invenção

25 São fornecidos métodos para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, em que o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Os métodos 30 compreendem a administração ao paciente humano de uma

quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. A invenção também fornece o uso de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa 158F (genótipo V/F ou F/F).

Também são fornecidos métodos de inibição de produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), que compreende a administração ao paciente humano de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD40. A invenção também fornece o uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa158F (V/F ou F/F).

Métodos e kits para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou autoimune que é tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$) são também fornecidos. Em algumas modalidades, os métodos compreendem: a) a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$); e b) a determinação do genótipo Fc γ RIIIa-158 do paciente humano (VN, V/F ou F/F); em que a doença inflamatória ou doença autoimune é tratável com um anticorpo anti-CD40 se o paciente humano é heterozigótico

ou homozigótico para Fc γ RIIIa158F (genótipo V/F ou F/F). A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de 5 um anticorpo anti-CD40. Kits da presente invenção que fornecem a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que é tratável com um anticorpo anti-CD40 compreendem reagentes para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente 10 humano.

A invenção também fornece métodos e kits para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$). Em algumas modalidades, os métodos 15 compreendem: a) a identificação de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou autoimune que está associada a células que expressam CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$); e b) determinação do 20 genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano (V/V, V/F ou F/F); em que, se o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento da 25 doença inflamatória ou doença autoimune. A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Kits da presente invenção que fornecem a seleção 30 de uma terapia de anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou

autoimune associada com células que expressam CD40 compreendem reagentes para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano.

A presente invenção também fornece métodos para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, em que os métodos compreendem a administração ao paciente humano de um anticorpo de internalização lenta. Em uma tal modalidade, uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 é administrada ao paciente humano de modo que o anticorpo anti-CD40 não seja significativamente internalizado por células que expressam CD40 após sua administração. Em uma outra tal modalidade, uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 é administrada ao paciente humano de modo que o anticorpo anti-CD40 permaneça substancialmente uniformemente distribuído na superfície de células que expressam CD40 após sua administração. Ainda em uma outra modalidade, um anticorpo anti-CD40 é administrado ao paciente humano de modo que uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 esteja presente na superfície de células que expressam CD40 no paciente humano após sua administração.

Anticorpos anti-CD40 para uso de acordo com a presente invenção se ligam especificamente ao antígeno de CD40. Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular, anticorpos monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por Fc γ RIIIa-158V humano, uma forte afinidade de ligação por

Fc γ RIIIa-158F humano, uma forte afinidade de ligação por Fc γ RIIIa-158V e Fc γ RIIIa-158F humano. Em algumas dessas modalidades, os anticorpos anti-CD40 podem se ligar a qualquer um dos dois alótipos de aminoácido 158 de Fc γ RIIIa (V ou F) em células killer naturais (NK) de um paciente humano com características de ligação que são adequadas para causar potente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Anticorpos anti-CD40 adequados incluem, mas não são limitados a, anticorpos anti-CD40 que são livres de significante atividade agonista, incluindo, por exemplo, anticorpos anti-CD40 que são um antagonista de sinalização CD40-CD40L em células que expressam CD40. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é selecionado do grupo que consiste em: a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12; b) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12; c) um anticorpo monoclonal que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:2, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:4, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:5, ambas as seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:4, e ambas as seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:5; d) um anticorpo monoclonal que tem uma seqüência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucléico que compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:1, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:3, e ambas as seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:1 e Id. de Seq. N°:3; e) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pela linha

de células de hibridoma 12.12; f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende resíduos 82-87 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9; g) um anticorpo monoclonal que se liga a 5 um epitopo que compreende resíduos 82-89 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9; h) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 em um ensaio de ligação competitiva; i) o anticorpo monoclonal do item a) anterior 10 ou um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores c)-h), em que o anticorpo é recombinantemente produzido; e j) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores a)-i), em que o fragmento 15 retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 humano.

Os métodos da presente invenção têm uso no tratamento de doenças inflamatórias ou doenças autoimunes que são associadas com células que expressam CD40. Exemplos 20 incluem, sem limitação, lúpus eritematoso disseminado (LED), lúpus discóide, nefrite de lúpus, sarcoidose, artrite inflamatória incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante, artrite da gota, rejeição de 25 transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crônica e/ou enxerto versus doença do hospedeiro, esclerose múltipla, síndrome de hiper IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, doença celíaca (enteropatia 30 sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa,

anemia hemolítica autoimune, psoríase, escleroderma, miastenia grave, púrpura trombocitopênica autoimune, tireoidite autoimune, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, doença do complexo imune, síndrome da disfunção imune de fadiga crônica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinemia, trombólise, cardiomiotipatia, pênfigo vulgar, fibrose intersticial pulmonar, diabetes melito tipo I e tipo II, hipersensibilidade tipo retardada tipo 1, 2, 3 e 4, alergia ou distúrbios alérgicos, respostas imunes indesejadas a proteínas terapêuticas, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite de contato irritante e alérgica, urticária, alergia mediada por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer's e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, inflamação pulmonar incluindo, sem limitação, rejeição a enxerto pulmonar, asma, sarcoidose, enfisema, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquite crônica, rinite alérgica e doenças alérgicas do pulmão como pneumonite de hipersensibilidade, pneumonia eosinofílica, bronquiolite obliterante devido à transplante de medula óssea e/ou pulmonar ou outras causas, aterosclerose de enxerto/flebosclerose de enxerto, fibrose pulmonar que resulta de doenças do colágeno, vasculares e doenças autoimunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso, bem como doenças inflamatórias ou doenças autoimunes associadas a células que expressam CD20. Os métodos da invenção são particularmente vantajosos com relação a doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas com

células que expressam CD40 e CD20. Desse modo, a presente invenção permite o tratamento de pacientes que têm uma doença inflamatória ou autoimune que é não responsiva ou refratária à terapia com outros agentes terapêuticos, incluindo anticorpos anti-CD20 para pacientes que são homozigóticos ou heterozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F).

Breve descrição dos desenhos

Figuras 1A-1F mostram resultados de uma análise de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (ADCC) em seis linhas de células.

Figuras 2A-2D mostram resultados de uma análise de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (ADCC) em células de paciente com CLL (n = 8).

Figura 3 resume os resultados de uma análise de ADCC em células de pacientes com CLL (n=9).

Figura 4 mostra os resultados de uma análise de ADCC em células de pacientes com CLL, com o uso de células NK efetoras de dois diferentes doadores.

Figura 5 mostra os resultados de quantificação de expressão em superfície de célula CD40 e CD20 em células de pacientes com CLL e células B normais.

Figura 6 sumariza a atividade ADCC para células com expressão em superfície de célula CD40 e CD20 quantificada.

Figura 7 é um gráfico em barras que mostra níveis de CHIR-12.12 ligado a superfície celular em linhas de células Daudi e ARH77.

Figura 8 mostra os resultados de investigação de internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células de pacientes com CLL por análise de FACS.

Figura 9 mostra os resultados de investigação de internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células B normais por microscopia confocal de anticorpos rotulados com FITC.

Figura 10 mostra os resultados de investigação de internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células de pacientes com CLL por microscopia confocal de anticorpos rotulados com Alexa488.

Figura 11 resume a relação entre atividade de ADCC e internalização.

Figura 12 é um gráfico em barra que mostra percentagem de lise máxima específica de células Daudi por CHIR-12.12 ou rituximab por células efetoras NK purificadas de doadores com diferentes genótipos de Fc γ RIIIa.

Figura 13 é um gráfico em barra que mostra a potência de ADCC (ED_{50}) de CHIR-12.12 ou rituximab sobre células Daudi por células efetoras NK purificadas de doadores com diferentes genótipos de Fc γ RIIIa.

Figura 14 resume ADCC comparativo de CHIR-12.12 e rituximab contra células de paciente com CLL (n=9) por células NK humanas de doadores humanos de múltiplos genótipos.

Descrição detalhada da invenção

Os inventores descobriram, de forma surpreendente, que os anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, são capazes de mediar potente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células alvo que expressam CD40 sob condições em que outros anticorpos que medeiam ADCC são menos eficazes ou relativamente ineficazes. Ao contrário de outros anticorpos, como rituximab (Rituxan $^{\circledR}$), anticorpos

anti-CD40 usados de acordo com a invenção podem se ligar a qualquer um dos dois alótipos de aminoácido 158 de Fc γ RIIIa (V or F) em células natural killer (NK) de paciente humano com características de ligação que são adequadas para causar potente ADCC. Esse achado é inesperado e representa um avanço em nossa capacidade para tratar doenças inflamatórias e doenças autoimunes por toda uma seção de um paciente.

Portanto, anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, podem ser usados no tratamento de doenças inflamatórias e doenças autoimunes associadas com células que expressam CD-40 em pacientes humanos heterozigóticos ou homozigóticos para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), além de pacientes humanos homozigóticos para Fc γ RIIIa-158V (genótipo V/V).

A invenção assim fornece um método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, em que o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. A invenção também fornece o uso de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa 158F (genótipo V/F ou F/F).

Como acima observado, a atividade clínica de rituximab

em NHL mostrou estar correlacionada com o genótipo de Fc γ RIIIa do paciente. Pacientes com o polimorfismo de 158aa de Fc γ RIIIa de F/F são menos responsivos a rituximab que aqueles com V/V ou V/F (por exemplo, veja, Cartron e cols. 5 (2002) *Blood* 99(3):754-758 ou Dall'Ozzo e cols. (2004) *Cancer Res.* 64:4664-4669. Como acima observado, Rituxan® está em experimentos clínicos para doenças autoimunes. Portanto, a presente invenção é vantajosa para o tratamento 10 de doenças inflamatórias e doenças autoimunes que não são responsivas ao tratamento com um anticorpo anti-CD20 como rituximab (Rituxan®). Além disso, tal potente morte de células alvo sem a necessidade de usar um conjugado anticorpo-toxina resultará em um medicamento de custo menor de produção e que tem menos efeitos colaterais.

¶ 15 Anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, podem ser usados em métodos para a inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), em adição a pacientes humanos homozigóticos para Fc γ RIIIa-158V 20 (genótipo V/V).

Portanto, a invenção fornece um método de inibição de produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), que compreende a administração ao referido 25 paciente humano de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD40, como CHIR-12.12. A invenção também fornece o uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano 30 heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (V/F ou

F/F) .

Não seria esperado por pessoa habilitada na técnica que se pudesse inibir a produção de anticorpos por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F).

A presente invenção permite o regime de tratamento selecionado para um paciente humano individual a ser baseado naquele genótipo de Fc γ RIIIa-158 do paciente por administração de um anticorpo anti-CD40 que medeia ADCC.

A invenção fornece um método para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxane), que compreende:

a) a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®);

b) a determinação do referido genótipo Fc γ RIIIa-158 do paciente humano (VN, V/F ou F/F);

em que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é tratável com um anticorpo anti-CD40 se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa158F (genótipo V/F ou F/F). A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

Esse método de identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um

anticorpo anti-CD40 pode ser facilmente realizável por uma pessoa habilitada na técnica com o uso de um kit diagnóstico adequado. O kit pode compreender reagentes adequados para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Portanto, a invenção também fornece um kit para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40, que compreende reagentes para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Kits adequados são descritos em maiores detalhes em outra parte nesta especificação.

A invenção também fornece um método para seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$) , que compreende:

a) a identificação de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$) ; e

b) determinação do referido genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano (V/V, V/F ou F/F) ;

em que, se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F) , um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento da referida doença inflamatória ou doença autoimune. Em particular, um anticorpo anti-CD40 pode ser selecionado em preferência ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$) . A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma

quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

Esse método de seleção de uma terapia de anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune pode ser facilmente realizado por uma pessoa habilitada na técnica com o uso de um kit diagnóstico adequado. O kit deve compreender reagentes adequados para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Portanto, a invenção também fornece um kit para a seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune associada com células que expressam CD40, que compreende reagentes para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano.

Os inventores descobriram, de forma surpreendente, que os anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, não são significativamente internalizados por células que expressam CD40 após administração. Ao contrário, anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, são substancialmente uniformemente distribuídos na superfície de células que expressam CD40 por um período de tempo significativo após a administração. Isso está em contraste com outros anticorpos, em particular anticorpos anti-CD20, como rituximab (Rituxan®).

A duração da ligação de CD40 na superfície de células que expressam CD40 e a distribuição uniforme do anticorpo anti-CD40 na superfície de células que expressam CD40 permitem que o anticorpo anti-CD40 medie potente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células alvo que expressam CD40, via ligação a um FcR, como

Fc γ RIIIa em células natural killer (NK).

Portanto, a invenção fornece um método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a 5 células que expressam CD40, o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo que o anticorpo anti-CD40 não seja significativamente internalizado por células que expressam 10 CD40 após a administração.

A invenção também fornece um método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, o método compreendendo a administração ao referido 15 paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo que o anticorpo anti-CD40 permaneça substancialmente uniformemente distribuído na superfície de células que expressam CD40 após administração.

20 A invenção também fornece um método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de um anticorpo anti-CD40, de modo que uma 25 quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 esteja presente na superfície de células que expressam CD40 no referido paciente humano após a administração.

30 Esses aspectos da invenção envolvem, assim, a administração a um paciente de um anticorpo de

internalização lenta. Por "anticorpo de internalização lenta", entende-se um anticorpo que permanece disposto na superfície celular por um período de tempo significativo. Como a pessoa habilitada estará ciente, essa propriedade 5 contrasta com propriedades consideradas vantajosas para várias aplicações terapêuticas que realmente requerem internalização de complexo anticorpo-receptor para que a terapia seja eficaz. Nesse contexto, um período de tempo significativo geralmente excede 3 horas, preferivelmente 6 10 horas, mais preferivelmente 12 horas, mais preferivelmente 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 144 horas, 168 horas ou mais.

Preferivelmente, pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo 15 menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, ou mais do anticorpo inicialmente disposto na superfície de uma célula que expressa CD40 permanece disposto na superfície da célula após o período de tempo significativo acima.

20 A internalização de anticorpos pode ser avaliada por vários ensaios. Por exemplo, linhas de células como a linha de células de linfoma Daudi, ou linha de células ARH77 MM, podem ser usadas para avaliar o efeito da ligação de anticorpo candidato em internalização. As células são 25 incubadas com IgG1 humana (anticorpo de controle) ou o anticorpo candidato em gelo (com 0,1% azida de sódio para bloquear a internalização) ou 37°C (sem azida de sódio) por um período de tempo, adequadamente 3 horas. Depois de uma lavagem com tampão de coloração frio (por exemplo, 30 PBS+1%BSA+0,1% azida de sódio), as células são coradas, por

exemplo, com IgG-FITC anti-humana de cabra por 30 minutos em gelo. O grau de coloração pode ser então avaliado; nesse exemplo, a intensidade fluorescente média geométrica (MFI) pode ser registrada, como por FACS Calibur. Outros ensaios 5 adequados serão aqueles conhecidos por aqueles habilitados na técnica (veja, por exemplo, <http://www.abgenix.com/documents/SBS2003%20poster.pdf>).

Em experimentos apresentados nos Exemplos 4 e 5 nesta especificação, nenhuma diferença na MFI foi observada entre 10 células incubadas com CH12.12 em gelo na presença de azida de sódio ou a 37°C na ausência de azida de sódio (veja as Figuras 7-10). Esses dados mostram que CH12.12, após ligação a CD40, não é internalizado e continua a ser apresentado na superfície celular.

15 Um resumo de técnicas e procedimentos padrão que podem ser empregados para utilizar a invenção é dado abaixo. Deve-se entender que esta invenção não é limitada à metodologia particular, protocolos, linhas de célula, vetores e reagentes descritos. Deve-se também compreender 20 que a terminologia aqui usada é para o objetivo de descrição de modalidades particulares apenas, e não se pretende que essa terminologia limite o escopo da presente invenção. A extensão da invenção é limitada apenas pelos termos das reivindicações em anexo.

25 Abreviações padrão para nucleotídeos e aminoácidos são usadas nessa especificação.

A prática da presente invenção empregará, a menos que indicado de outra forma, técnicas convencionais de biologia molecular, microbiologia, tecnologia de DNA recombinante e 30 imunologia, que estão dentro da habilidade daqueles que

trabalham na técnica.

Tais técnicas são totalmente explicadas na literatura. Exemplos de textos particularmente adequados para consulta incluem os seguintes: Sambrook e cols. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual* (2^a ed.); D.N. Glover, ed. (1985) *DNA Cloning, Volumes I e II*; M.J. Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984) *Transcription and Translation*; R.I. Freshney, ed. (1986) *Animal Cell Culture; Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning; Methods in Enzymology series* (Academic Press, Inc.), especialmente volumes 154 & 155; J.H. Miller and M.P. Calos, eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory); Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London); Scopes (1987) *Protein Purification: Principles and Practice* (2^a ed.; Springer Verlag, N.Y.); e D.M. Weir e C. C. Blackwell, eds. (1986) *Handbook of Experimental Immunology*, Volumes I-IV.

Os métodos da invenção envolvem o uso de anticorpos anti-CD40 no tratamento de doenças inflamatórias e doenças autoimunes associada com células que expressam CD40.

Por "CD40", "antígeno CD40" ou "receptor de CD40", entende-se a glicoproteína de transmembrana de 50-55 kDa da família de receptor de fator de necrose tumoral (TNF) (veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.674.492 e 4.708.871; Stamenkovic e cols. (1989) *EMBO* 8:1403; Clark (1990) *Tissue Antigens* 36:33; Barclay e cols. (1997) *The*

Leucocyte Antigen Facts Book (2^a ed.; Academic Press, San Diego)). Foram identificadas duas isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcrito combinadas alternativamente desse gene. A primeira isoforma (também conhecida como "isoforma longa" ou "isoforma 1") é expressa como um polipeptídeo precursor de 277 aminoácidos (Id. de Seq. N°:9; relatada inicialmente como N° de Acesso no GenBank CAA43045 e identificada como isoforma 1 no N° de Acesso no GenBank NP_001241), codificada por Id. de Seq. N°:8 (veja, N°s de Acesso no GenBank X60592 e NM_001250)), que tem uma seqüência sinalizadora representada pelos primeiros 19 resíduos. A segunda isoforma (também conhecida como a "isoforma curta" ou "isoforma 2") é expressa como um polipeptídeo precursor de 203 aminoácidos (Id. de Seq. N°:7; N° de Acesso no GenBank NP_690593), codificada por Id. de Seq. N°:6 (N° de Acesso no GenBank NM_152854), que também tem uma seqüência sinalizadora representada pelos primeiros 19 resíduos. Os polipeptídeos precursores dessas duas isoformas de CD40 humano compartilham em comum seus primeiros 165 resíduos (ou seja, resíduos 1-165 de Id. de Seq. N°:7 e Id. de Seq. N°:9). O polipeptídeo precursor da isoforma curta (mostrada em Id. de Seq. N°:7) é codificado por uma variante do transcrito (Id. de Seq. N°:6) desprovida de um segmento codificador, o que leva a uma mudança na estrutura de tradução; a isoforma de CD40 resultante contém um terminal C mais curto e distinto (resíduos 166-203 de Id. de Seq. N°:7) daquele contido na isoforma longa de CD40 (terminal C mostrado nos resíduos 166-277 de Id. de Seq. N°:9). Para as finalidades da presente invenção, o termo "antígeno CD40", "antígeno de

superfície celular CD40", "receptor de CD40" ou "CD40" engloba tanto a isoforma curta quanto a longa de CD40. O antígeno CD40 pode ser completa ou parcialmente glicosilado.

5 Como apontado em outra parte nesta especificação, CD40 é encontrado na superfície de células B humanas normais e neoplásicas, células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T CD8+, células endoteliais, células monocíticas e epiteliais, células T ativadas, plaquetas ativadas, células 10 de músculo liso vascular inflamadas, eosinófilos, membranas sinoviais em artrite reumatóide, fibroblastos dérmicos e outros tipos de células não linfóides.

"Células que expressam CD40" significa qualquer tipo de célula normal ou maligna que expresse níveis detectáveis 15 do antígeno CD40. Preferivelmente, as células que expressam CD40 são células que expressam níveis detectáveis de antígeno CD40 de superfície celular. Métodos para a detecção da expressão de CD40 em células são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, técnicas de PCR, 20 imunoistoquímica, citometria de fluxo, *Western blot*, ELISA, e semelhantes. Esses métodos permitem a detecção de mRNA de CD40, antígeno CD40 e antígeno CD40 de superfície celular. A detecção de expressão de CD40 de superfície celular pode ser realizada como descrito no Exemplo 3 nesta 25 especificação, ou por outros métodos adequados.

Por "ligante de CD40" ou "CD40L", entende-se primariamente a proteína de transmembrana de 32-33 kDa que também existe em duas formas menores solúveis biologicamente ativas, de 18 kDa e 31 kDa, respectivamente 30 (Graf e cols. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749- 1754; Mazzei

e cols. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle e cols. (1996) *J Biol. Chem.* 271:5965-5967). CD40L humano é também conhecido como CD154 ou gp39. Por "ligante de CD40" ou "CD40L", também se entende qualquer outro peptídeo, 5 polipeptídeo ou proteína que possa ligar e ativar uma ou mais vias de sinalização de CD40. Portanto, "ligantes de CD40" incluem, sem limitação, proteínas de ligante de CD40 de comprimento total e variantes e fragmentos destas que retêm suficiente atividade para realizar a função de 10 ligação e estímulo da sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Modificações a um ligante de CD40 nativo, por exemplo, CD40L humano, incluem, sem limitação, substituições, deleções, truncções, extensões, proteínas de fusão, fragmentos, peptidomiméticos e outros.

15 Por "sinalização de CD40", entende-se qualquer uma das atividades biológicas que resultam da interação de CD40 de superfície celular com um ligante de CD40 ou outro agonista, como um anticorpo agonista. Exemplos de sinalização de CD40 são sinais que levam à proliferação e 20 sobrevivência de células que expressam CD40, e estímulo de uma ou mais vias de sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Uma "via de sinalização de CD40" ou "via de transdução de sinal" deve significar pelo menos uma reação bioquímica, ou um grupo de reações bioquímicas, que 25 resultam de interação do receptor de CD40 com um ligante de CD40, por exemplo, CD40L, e que geram um sinal que, quando transmitido através da via de sinal, leva à ativação de uma ou mais moléculas abaixo na cascata de sinalização. As vias de transdução de sinal envolvem inúmeras moléculas de 30 transdução de sinal que levam à transmissão de um sinal do

receptor de CD40 de superfície celular por toda a membrana plasmática de uma célula, e através de uma ou mais em uma série de moléculas de transdução de sinal, através do citoplasma da célula, e, em alguns casos, no núcleo da 5 célula. De interesse particular para a presente invenção são vias de transdução de sinal de CD40, que incluem a via de sinalização de AKT, que leva à ativação de AKT, e finalmente à ativação de NF-κB por meio da via de sinalização de NF-κB; e proteína quinase ativada por vias 10 de sinalização de mitógeno (MAPK), incluindo a via de sinalização de MEK/ERK e a via de sinalização de MEK/p38, que levam à ativação de ERK e p38, respectivamente.

Como acima observado, a presente invenção fornece um método para o tratamento de um paciente humano para uma 15 doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, em que o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcyRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma quantidade 20 terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

Por "paciente humano", entende-se um paciente humano que é atingido, tem risco de desenvolver, ou está em recaída de qualquer doença inflamatória ou doença autoimune 25 que está associada com células que expressam CD40.

Por "doença inflamatória ou doença autoimune associada com células que expressam CD40", entende-se qualquer doença inflamatória ou doença autoimune associada com células que expressam CD40. A doença inflamatória ou doença autoimune 30 associada com células que expressam CD40 pode ser uma

doença inflamatória ou doença autoimune associada com um nível indesejável de sinalização de CD40 em células que expressam CD40, ou a doença inflamatória ou doença autoimune pode ser apenas indiretamente associada com células que expressam CD40. Por "uma doença inflamatória ou doença autoimune associada com um nível indesejável de sinalização de CD40", entende-se uma doença inflamatória ou doença autoimune cujo desenvolvimento ou progressão está associado com um nível indesejável de sinalização de CD40.

Por "um nível indesejável de sinalização de CD40", entende-se qualquer nível fisiologicamente indesejável de sinalização de CD40 que pode ocorrer em células que expressam CD40 em um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune.

Doenças inflamatórias são caracterizadas por inflamação e destruição tecidual, ou uma combinação destas. "Doença inflamatória" inclui qualquer processo inflamatório com mediação imune em que o evento de iniciação ou alvo da resposta imune envolva antígeno(s) não-próprio(*self*), incluindo, por exemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos desconhecidos ou alérgenos.

Como aqui usado, o termo "auto-imunidade" é geralmente compreendido como englobando processos inflamatórios imuno-mediados que envolvem antígenos "*próprio*". Em doenças autoimunes, antígenos *próprio* despertam respostas imunes do hospedeiro.

A presente invenção pode ser usada no tratamento de inflamação associada com rejeição a transplante de tecidos. "Rejeição de transplante" ou "rejeição de enxerto" se

refere a qualquer resposta imune montada pelo hospedeiro contra um enxerto incluindo, sem limitação, antígenos HLA, antígenos do grupo sanguíneo, e semelhantes.

A invenção também pode ser usada para o tratamento de doença enxerto versus hospedeiro, como a que ocorre associada ao transplante de medula óssea, por exemplo. Nessa doença enxerto versus hospedeiro, a medula óssea doadora inclui linfócitos e células que amadurecem tornando-se linfócitos. Os linfócitos do doador reconhecem os抗ígenos do receptor como não-próprio e montam uma resposta inflamatória imune. Desse modo, como aqui usado, "doença enxerto versus hospedeiro" ou "reação enxerto versus hospedeiro" se refere a qualquer resposta imune mediada por células T na qual os linfócitos do doador reagem com os抗ígenos do hospedeiro.

Doenças inflamatórias e doenças autoimunes que podem ser tratadas de acordo com os métodos da invenção incluem, sem limitação, lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus discóide, nefrite lúpica, sarcoidose, artrite inflamatória, incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante e artrite da gota, rejeição de um transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda, ou crônica e/ou doença enxerto versus hospedeiro, esclerose múltipla, síndrome de hiper IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, doença celíaca (enteropatia sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoríase, esclerodermia, miastenia gravis, púrpura trombocitopênica autoimune, tireoidite autoimune, doença de

Grave, tireoidite de Hashimoto, doença de complexo imune, síndrome de disfunção de fadiga crônica imune (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinemia, trombólise, cardiomiopatia, pênfigo vulgar, fibrose pulmonar intersticial, diabetes melito Tipo I e Tipo II, hipersensibilidade retardada do tipo 1, 2, 3, e 4, alergia ou distúrbios alérgicos, respostas imunes indesejadas/não intencionais às proteínas terapêuticas (veja por exemplo, Pedido de Patente U.S. N° US 2002/0119151 e Koren, e cols.

(2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:349-60), asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite de contacto alérgica e irritante, urticária, alergia mediada por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer, polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica e semelhantes. Em outras modalidades, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são úteis no tratamento de inflamação pulmonar incluindo, sem limitação, rejeição de enxerto de pulmão, asma, sarcoidose, enfisema, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquite crônica, rinite alérgica e doenças alérgicas do pulmão, tais como pneumonite por hipersensibilidade, pneumonia eosinofílica, bronquilitis obliterante causada por transplante de medula óssea e/ou de pulmão ou por outras causas, aterosclerose do enxerto/fleboesclerose do enxerto, além de fibrose pulmonar causada por doenças do colágeno, vasculares e autoimunes, tais como artrite reumatóide e lúpus eritematoso.

A doença inflamatória ou doença autoimune pode ser uma doença inflamatória ou doença autoimune associada com

células que expressam CD40. Exemplos de doenças autoimunes dependentes de anticorpo incluem artrite reumatóide, psoríase, lúpus eritematoso disseminado, doença de Crohn, miastenia grave, púrpura trombocitopênica idiopática ou

5 síndrome de Sjogren.

Além disso, a depleção de células B e de outras células que sustentam CD40 pode limitar a ativação de células T por sinalização através de ligação de ligante de CD40. Portanto, a depleção de células B e de outras células

10 que sustentam CD40 pode ser usada para tratar doenças autoimunes e inflamatórias mediadas por células T, como esclerose múltipla, rejeição a enxerto, enxerto versus doença do hospedeiro, doença de Alzheimer ou diabetes. Ela também pode ser útil para transplantes de medula óssea.

15 A presente invenção é particularmente vantajosa em relação a doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas com células que expressam CD40. CHIR-
12.12, aqui revelado, pode ser usado para tratar pacientes que têm uma doença inflamatória ou autoimune que é

20 refratária à terapia com outros agentes terapêuticos, incluindo anticorpos anti-CD20, como Rituxan®, como descrito em maiores detalhes em outra parte nesta especificação.

"Tratamento" é aqui definido como a aplicação ou

25 administração de um anticorpo anti-CD40 a um indivíduo, ou a aplicação ou administração de um anticorpo anti-CD40 a um tecido ou linha de células isolada de um paciente, em que o indivíduo tem uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, um sintoma associado a uma doença autoimune

30 e/ou doença inflamatória, ou uma predisposição para ter uma

doença autoimune e/ou doença inflamatória, em que a finalidade seja a curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, ou afetar a doença autoimune e/ou doença inflamatória, qualquer sintoma associado com a

5 doença autoimune e/ou doença inflamatória, ou a predisposição para o desenvolvimento da doença autoimune e/ou doença inflamatória. Por "tratamento", entende-se a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CD40 a um indivíduo, ou a

10 aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CD40 a um tecido ou linha de células isoladas de um indivíduo, em que o indivíduo tem uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, um sintoma associado a uma doença autoimune e/ou doença inflamatória,

15 ou uma predisposição para o desenvolvimento de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, em que a finalidade seja curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar ou afetar a doença autoimune e/ou doença inflamatória, quaisquer sintomas associados da doença

20 autoimune e/ou doença inflamatória, ou a predisposição para o desenvolvimento de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória.

"Atividade antiinflamatória" significa uma redução ou prevenção da inflamação. A terapia com um anticorpo anti-

25 CD40, como definido em outra parte nesta especificação, causa uma resposta fisiológica que é benéfica com relação ao tratamento de uma doença autoimune e/ou de uma doença inflamatória, em que a doença envolve células que expressam o antígeno CD40. Reconhece-se que os métodos da invenção

30 podem ser úteis na prevenção de alteração fenotípica em

células, tais como proliferação, ativação, e semelhantes.

Nos métodos terapêuticos da presente invenção, pelo menos um anticorpo anti-CD40 como definido em outra seção é usado para promover uma resposta terapêutica positiva e com 5 relação a uma doença inflamatória ou doença autoimune.

Por "resposta terapêutica positiva", com relação a uma doença autoimune e/ou a uma doença inflamatória, entende-se uma melhora na doença em associação à atividade antiinflamatória do anticorpo, e/ou uma melhora nos 10 sintomas associados à doença. Ou seja, pode ser observado um efeito anti-proliferativo, a prevenção de proliferação adicional da célula que expressa CD40, uma redução na resposta inflamatória incluindo, sem limitação, secreção reduzida de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, 15 proteases, imunoglobulinas (nos casos em que a célula que abriga CD40 for uma célula B), combinações destes, e semelhantes, produção aumentada de proteínas antiinflamatórias, uma redução no número de células auto-reativas, um aumento na tolerância imunológica, inibição da 20 sobrevida de célula auto-reactiva e/ou uma diminuição em um ou mais sintomas mediados por estimulação de células que expressam CD40. Tais respostas terapêuticas positivas não são limitadas pela via de administração, e podem compreender a administração ao doador, ao tecido do doador 25 (como, por exemplo, à perfusão do órgão), ao hospedeiro, qualquer combinação destes, e outros.

A resposta clínica pode ser avaliada com o uso de técnicas de rastreamento, tais como ressonância nuclear magnética (RNM), exames da raios x, tomografia 30 computadorizada (TC), citometria de fluxo ou análise com

classificador de células ativadas por fluorescência (FACS), histologia, patologia macroscópica, e bioquímica do sangue, incluindo, sem limitação, alterações detectáveis por ELISA, RIA, cromatografia, e outros. Além dessas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo submetido à terapia com o anticorpo anti-CD40 pode apresentar o efeito benéfico de uma melhora nos sintomas associados à doença.

"Dose ou quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade de anticorpo antagonista anti-CD40 ou de fragmento de ligação de antígeno deste que, quando administrada, ocasiona uma resposta terapêutica positiva com relação ao tratamento de um indivíduo com uma doença associada ao CD40. Por "dose terapeuticamente ou profilaticamente eficaz" ou "quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz", entende-se uma quantidade de anticorpo anti-CD40 que, quando administrada, ocasiona uma resposta terapêutica positiva com relação ao tratamento de um indivíduo com uma doença inflamatória ou doença autoimune associada com células que expressam CD40.

Dosagens adequadas são descritas em maiores detalhes em outra parte nesta especificação. O método de tratamento pode compreender uma única administração de uma dose terapeuticamente eficaz ou múltiplas administrações de uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40, como descrito em maiores detalhes em outra parte nesta especificação.

Os métodos da invenção são particularmente úteis para o tratamento de doenças inflamatórias ou doenças autoimunes, que incluem aquelas acima listadas, que são refratárias a uma ou mais das terapias conhecidas para

doenças inflamatórias ou doenças autoimunes. Tais terapias incluem, sem limitação, cirurgia ou procedimentos cirúrgicos (por exemplo, esplenectomia, linfadenectomia, tiroidectomia, plasmaforese, leucoforese, transplante de células, tecidos, ou órgão, procedimento intestinais, perfusão de órgão, e outros), terapia por radiação, terapia como terapia com esteróide e terapia não esteróide, terapia com hormônios, terapia com citocina, terapia com agentes dermatológicos (por exemplo, agentes tópicos usados para tratar condições da pele como alergias, dermatite de contato, e psoríase), terapia imunossupressora, e outras terapias antiinflamatórias com anticorpo monoclonal, e outros, como descrito em maiores detalhes em outra parte nesta especificação. Por "refratário", entende-se que a doença inflamatória ou doença autoimune particular é resistente, ou não responsiva a uma terapia em particular. Uma doença inflamatória ou doença autoimune pode ser refratária a uma terapia particular a partir do início do tratamento com a terapia particular (ou seja, não responsiva à exposição inicial à terapia), ou como um resultado do desenvolvimento de resistência à terapia, durante um primeiro período de tratamento com a terapia ou durante um período de tratamento subsequente com a terapia. Portanto, a presente invenção é útil para o tratamento de um paciente humano que é refratário a uma terapia para doenças inflamatórias ou autoimunes, quando aquele paciente humano é resistente ou não responsivo àquela terapia.

Os métodos da presente invenção envolvem o uso de anticorpos anti-CD40. "Anticorpos" são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000

dáltons, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, embora o número de ligações dissulfeto varie entre as cadeias pesadas de isótipos diferentes de imunoglobulinas. Cada cadeia pesada e leve também tem pontes dissulfeto dentro da cadeias espaçadas regularmente. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável (VH), seguido por diversos domínios constantes.

Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (VI) e um domínio constante na outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está com o domínio variável da cadeia pesada.

Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os domínios variáveis da cadeia leve e pesada. O termo "variável" se refere ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem intensamente em termos de seqüências entre anticorpos. As regiões variáveis conferem especificidade de ligação de antígeno. Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, como ligação de receptor Fc (FcR), participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpo, início de citotoxicidade dependente de complemento, e desgranulação de mastócitos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem ser designadas para um de dois tipos distintos, chamadas kappa (κ) e lambda (λ), com base nas seqüências de aminoácidos de seus domínios

constantes.

Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas compreendem classes diferentes. Há cinco classes principais de imunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser ainda divididas em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados alfa, delta, epsilon, gama e mu, respectivamente. As estruturas da subunidade e as configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Isótipos diferentes têm diferentes funções efetoras. Por exemplo, os isótipos de IgG1 e IgG3 humanos têm atividade de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). Anticorpos IgG1, em particular anticorpos IgG1 humanos, são particularmente úteis nos métodos da presente invenção.

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferivelmente, as células expressam pelo menos Fc γ RIII e realizam a função efetora de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC), células natural killer (NK), monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, preferindo-se PBMCs e células NK. Anticorpos que têm atividade de ADCC são tipicamente do isótipo IgG1 ou IgG3. Além do isolamento de anticorpos IgG1 e IgG3, anticorpos de mediação da ADCC podem ser sintetizados

projetando-se uma região variável a partir de um fragmento de um anticorpo ou região variável não ADCC em uma região constante de isótipo IgG1 ou IgG3.

Os termos "receptor Fc" ou "FcR" são usados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de seqüência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas combinadas desses receptores. Receptores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (um "receptor de ativação") e Fc γ RIIB (um "receptor de inibição"), que têm seqüências de aminoácidos similares que diferem essencialmente nos domínios citoplasmáticos destas. O receptor de ativação Fc γ RIIA contém um motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) em seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição Fc γ RIIB contém um motivo de inibição de imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático (veja Dacron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15:203). FcRs são revisados em Ravetch e Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991); Capel e cols. (1994) *Immunomethods* 4:25-34; e de Haas e cols. (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341. Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são aqui englobados pelo termo "FcR". O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternas ao feto (Guyer e cols. (1976) *J. Immunol.* 117:587, e Kim e cols. (1994) *J. Immunol.* 24:249).

O termo "anticorpo" é usado em seu sentido mais amplo

e cobre anticorpos totalmente montados, fragmentos de anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 (por exemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, e outros fragmentos), anticorpos de cadeia 5 única, *diabodies*, quimeras de anticorpo, anticorpos híbridos, anticorpos biespecíficos, anticorpos humanizados, e outros, e peptídeos recombinantes que compreendem os citados anteriormente. O termo "anticorpo" abrange tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais.

10 Como aqui usado, "anticorpos anti-CD40" englobam qualquer anticorpo que reconheça especificamente o antígeno CD40. Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos monoclonais anti-CD40, exibem uma forte afinidade de 15 ligação para o antígeno CD40. Tais anticorpos monoclonais exibem uma afinidade por CD40 (K_D) de pelo menos 10^{-5} M, pelo menos 3×10^{-5} M, preferivelmente pelo menos 10^{-6} M, ou pelo menos 10^{-7} M, mais preferivelmente pelo menos 10^{-8} M ou pelo menos 10^{-12} M, medida usando um ensaio-padrão como, por 20 exemplo, Biacore™. A análise Biacore é conhecida na técnica e são fornecidos detalhes no *BIAapplications Handbook*. Métodos descritos em WO 01/27160 podem ser usados para modular a afinidade de ligação.

Por "reconhece especificamente" ou "se liga 25 especificamente a", entende-se que o anticorpo anti-CD40 não se liga a抗ígenos não relacionados, como o antígeno CD20.

Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos 30 monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por

Fc γ RIIIa-158V humano. Preferivelmente, um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a Fc γ RIIIa-158V humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 0,5 μ M quando medida com o uso de um ensaio-padrão como, 5 por exemplo, BiacoreTM. Como revelado no Exemplo 6 nesta especificação, o anticorpo CHIR-12.12 se liga a Fc γ RIIIa-158V humano com uma afinidade (K_D) de 492 nM.

Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos 10 monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por Fc γ RIIIa-158F humano. Preferivelmente, um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a Fc γ RIIIa-158F humano como uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 12 μ M quando medida com o uso de um ensaio-padrão como 15 BiacoreTM. Preferivelmente, o anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a Fc γ RIIIa-158F humano como uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 10 μ M, pelo menos cerca de 8 μ M, pelo menos cerca de 6 μ M, pelo menos cerca de 5 μ M, pelo menos cerca de 4 μ M, ou pelo menos cerca de 20 μ M. Como revelado no Exemplo 6 nessa, o anticorpo CHIR-12.12 se liga a Fc γ RIIIa-158F humano com uma afinidade (K_D) de 2,8 μ M.

Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos 25 monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por Fc γ RIIIa-158V e Fc γ RIIIa-158F humanos. Preferivelmente, um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a Fc γ RIIIa-158V humano como uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 0,5 μ M e se liga a Fc γ RIIIa-158F humano como 30 uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 12 μ M, quando

medida com o uso de um ensaio-padrão como BiacoreTM.

Os anticorpos para uso nos métodos da presente invenção podem ser produzidos com o uso de qualquer método de produção de anticorpo adequado conhecido por aqueles de 5 habilidade na técnica.

O anticorpo anti-CD40 usado nos métodos da presente invenção podem ser um anticorpo policlonal. Portanto, soros policlonais podem ser preparados por métodos convencionais. Em geral, inicialmente é usada uma solução contendo o 10 antígeno de interesse (no caso, o antígeno CD40) para imunizar um animal adequado, preferivelmente um camundongo, rato, coelho ou cabra. Preferem-se coelhos ou cabras para a preparação de soros policlonais em função do volume de soro que pode ser obtido e da disponibilidade de anticorpos 15 anti-coelho e anti-cabra rotulados.

Os soros desses animais imunizados pode ser rastreado quanto à reatividade de anticorpo contra o antígeno inicial. Podem ser isolados linfócitos dos linfonodos ou de células esplênicas e podem ainda ser rastreados quanto às 20 células B pela seleção de células CD138-negativas e CD19-positivas. Em um aspecto, tais culturas de células B (BCCs) podem ser fundidas às células de mieloma para gerarem hibridomas, como detalhado nessa.

Soros policlonais também podem ser preparados em um 25 animal transgênico, preferivelmente um camundongo possuindo loci de imunoglobulina humana. Em uma modalidade preferida, células Sf9 que expressam a proteína de interesse, (nesse caso, o antígeno CD40), são usadas como o imunógeno. A imunização também pode ser realizada pela mistura ou 30 emulsificação da solução contendo antígeno em soro

fisiológico, preferivelmente em um adjuvante como, por exemplo, adjuvante completo de Freund, e injetando-se a mistura ou emulsão por via parenteral (geralmente por via subcutânea ou intramuscular). Uma dose de 50-200 µg/injeção é tipicamente suficiente. A imunização é geralmente reforçada 2-6 semanas mais tarde com uma ou mais injeções da proteína em soro fisiológico, preferivelmente usando o adjuvante incompleto de Freund. É possível, alternativamente, gerar anticorpos por imunização *in vitro* usando métodos conhecidos na técnica, o que, para as finalidades desta invenção, é considerado equivalente à imunização *in vivo*. Anti-soros policlonais são obtidos por sangramento do animal imunizado em um recipiente de vidro ou de plástico, incubação do sangue a 25°C por um hora, seguindo por incubação a 4°C por 2-18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (por exemplo, 1.000 x g por 10 minutos). Cerca de 20-50 ml por sangramento podem ser obtidos de coelhos.

A produção das células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) é revelada na Patente U.S. N° 6.004.552, aqui incorporada por referência. Resumidamente, seqüências que codificam CD40 humano são recombinadas em um baculovírus usando vetores de transferência. Os plasmídeos são co-transfetados com DNA de baculovírus do tipo selvagem em células Sf9. Células Sf9 recombinantes infectadas com baculovírus são identificadas e purificadas por clonagem.

O anticorpo anti-CD40 usado nos métodos da presente invenção pode ser um anticorpo monoclonal. O termo "anticorpo monoclonal" (e "mAb") como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de

anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto quanto às possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades 5 menores. O termo não se limita em relação à espécie do anticorpo e não requer a produção do anticorpo por qualquer método particular.

Ao contrário das preparações de anticorpo policlonal, que tipicamente incluem diferentes anticorpos dirigidos 10 contra diferentes determinantes antigênicos (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante (epitopo) no antígeno.

Por "epitopo" entende-se a parte de uma molécula antigênica para a qual um anticorpo é produzido e à qual o 15 anticorpo irá se ligar. Epitopos podem compreender resíduos de aminoácidos lineares (ou seja, os resíduos dentro do epitopo são dispostos seqüencialmente um após o outro de forma linear), resíduos de aminoácidos não lineares (aqui denominados "epitopos não lineares"; esses epitopos não são 20 dispostos seqüencialmente), ou resíduos de aminoácidos tanto lineares quanto não lineares. Um anticorpo monoclonal anti-CD40 adequado para uso nos métodos da presente invenção será capaz de se ligar especificamente a um epitopo e, antígeno CD40 humano expresso na superfície de 25 uma célula humana, ou seja, um epitopo que é exposto ao exterior da célula.

Os anticorpos monoclonais as serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler e cols. (1975) 30 Nature 256:495, ou podem ser feitos pelo métodos de DNA

recombinante (veja, por exemplo, Patente U.S. No. 4.816.567). Anticorpos monoclonais também podem ser isolados de bibliotecas de fago de antícorpo geradas com a utilização das técnicas descritas, por exemplo, em 5 McCafferty e cols. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) e na Patente U.S. N° 5.514.548. Clackson e cols. (1991) *Nature* 352:624-628 e Marks e cols. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 descrevem o isolamento de anticorpos murídeos e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fago. 10 Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (na faixa de nM) por embaralhamento de cadeia (Marks e cols. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como estratégia para a construção de 15 bibliotecas de fago bem grandes (Waterhouse e cols. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2.265-2.266). Desse modo, essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais de hibridoma de antícorpo monoclonal para o isolamento de anticorpos monoclonais.

20 No método tradicional de Kohler e cols. (1975) *Nature* 256:495-496, tipicamente, um camundongo é imunizado com uma solução contendo um antígeno. A imunização pode ser realizada pela mistura ou emulsificação da solução contendo antígeno em soro fisiológico, preferivelmente em um 25 adjuvante como, por exemplo, adjuvante completo de Freund, e injeção da mistura ou da emulsão por via parenteral. Qualquer método de imunização conhecido na técnica pode ser usado para se obter os anticorpos monoclonais da invenção. Após imunização do animal, o baço (e, opcionalmente, vários 30 linfonodos grandes) são removidos e dissociados em células

únicas. As células esplênicas podem ser rastreadas pela aplicação de uma suspensão de células em uma placa ou poço revestido com o antígeno de interesse. As células B que expressam imunoglobulina ligada à membrana específica para 5 o antígeno se ligam à placa e não saem com o enxágüe. As células B resultantes, ou todas as células esplênicas dissociadas, são então induzidas a se fundirem com células de mieloma para formarem hibridomas, e são cultivadas em um meio seletivo. As células resultantes são plaqueadas por 10 diluição serial e são testadas quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno de interesse (e que não se ligam aos抗ígenos não relacionados). Os hibridomas secretores de anticorpo monoclonal (mAb) selecionados são então cultivados *in vitro* 15 (por exemplo, em frascos de cultura de tecido ou em reatores de fibra oca) ou *in vivo* (como ascites em camundongos).

Em um outro aspecto, culturas de célula B podem ser avaliadas também para reatividade contra o antígeno 20 inicial, preferivelmente. Tais avaliações incluem ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) com a proteína alvo/antígeno, um ensaio de competição com anticorpos conhecidos que se ligam ao antígeno de interesse, e ligação 25 *in vitro* a CHO transfetada transitoriamente ou outras células que expressam o antígeno alvo.

Quando os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção tiverem que ser preparados usando métodos de DNA recombinante, o DNA que codifica os anticorpos monoclonais 30 será prontamente isolado e seqüenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, com a utilização de sondas de

oligonucleotídeo que são capazes de se ligar especificamente aos genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murídeos). As células de hibridoma aqui descritas servem como uma fonte preferida de tal DNA.

5 Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras como, por exemplo, células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que de outra forma não produzem a

10 proteína de imunoglobulina, para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA que codifica o antícorpo incluem Skerra e cols. (1993) *Curr. Opinion in Immunol.*

15 5:256 e Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151.

Alternativamente, o antícorpo pode ser produzido em uma linha de células como uma linha de células CHO, como revelado nas Patentes U.S. N°s 5.545.403; 5.545.405; e 5.998.144, aqui incorporadas por referência. Resumidamente,

20 a linha de células é transfectada com vetores capazes de expressar uma cadeia leve e uma cadeia pesada, respectivamente. Pela transfecção de duas proteínas em vetores separados, podem ser produzidos anticorpos quiméricos. Outra vantagem é a glicosilação correta do

25 antícorpo.

Uma "célula hospedeira", como aqui usada, se refere a um microorganismo ou uma célula ou linha de células eucarióticas cultivadas como uma entidade unicelular que pode ser, ou que foi, usada como receptora para um vetor recombinante, ou outros polinucleotídeos de transferência,

e inclui a prole da célula original que foi transfectada. Entende-se que a prole de uma única célula pode não ser necessariamente completamente idêntica em morfologia ou em complemento de DNA genômico ou total à parente original, em 5 função de uma mutação natural, acidental ou deliberada.

Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40, como CHIR-12.12, é produzido em células CHO com o uso do sistema de expressão gênica GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que utiliza glutamina sintetase como um 10 marcador. Veja, também as Patentes U.S. N°s 5.122.464; 5.591.639; 5.658.759; 5.770.359; 5.827.739; 5.879.936; 5.891.693; e 5.981.216; cujos conteúdos são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Anticorpos monoclonais para CD40 são conhecidos na 15 técnica. Veja, por exemplo, as seções dedicadas ao antígeno da célula B em McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nova York); Patentes U.S. N°s 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; Publicação Internacional N°s WO 00/63395, WO 02/28905 e WO 20 02/28904; Gordon e cols. (1988) *J. Immunol.* 140:1.425; Valle e cols. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1.463; Clark e cols. (1986) *PNAS* 83:4.494; Paulie e cols. (1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon e cols. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1.535; Jabara e cols. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1.861; 25 Zhang e cols. (1991) *J. Immunol.* 146:1.836; Gascan e cols. (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau e cols. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8; e Banchereau e cols. (1991) *Science* 251:70; todos os quais são aqui incorporados por referência.

30 Como acima observado, o termo "anticorpo" como aqui

usado engloba anticorpos quiméricos. Por anticorpos "quiméricos" significam anticorpos que são, principalmente, derivados com o uso de técnicas de ácido desoxirribonucléico recombinante e que compreendem 5 componentes tanto humanos (incluindo espécies imunologicamente "relacionadas", por exemplo, chimpanzé) quanto não humanos. Desse modo, a região constante do anticorpo quimérico é, principalmente, substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; 10 a região variável do anticorpo quimérico é mais preferivelmente derivada de uma fonte não humana e tem a especificidade antigênica desejada para o antígeno de interesse (CD40). A fonte não humana pode ser qualquer fonte vertebrada que possa ser usada para gerar anticorpos 15 para um antígeno CD40. Tais fontes não humanas incluem, sem limitação, roedores (por exemplo, coelho, rato, camundongo etc.; veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 4.816.567, aqui incorporada por referência) e primatas não humanos (por exemplo, macaco do Velho Mundo, pongídeos etc.; veja, por 20 exemplo, as Patentes U.S. N°s 5.750.105 e 5.756.096; aqui incorporadas por referência).

Como acima observado, o termo "anticorpo" como aqui usado engloba anticorpos humanizados. Por "Humanizados" significa formas de anticorpos que contêm seqüência mínima 25 derivada de seqüências de imunoglobulina não humana. Na maioria dos casos, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região hipervariável (também conhecida como região determinante de complementaridade ou CDR) do 30 receptor são substituídos por resíduos de uma região

hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador) como, por exemplo, camundongo, rato, coelho, ou primata não humano, tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. A frase "região determinante de complementaridade" se refere às seqüências de aminoácidos que em conjunto definem a afinidade e especificidade de ligação da região Fv natural de um sítio de ligação nativo de imunoglobulina. Veja, por exemplo, Chothia e cols. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat e cols. (1991) "U.S. Dept. of Health and Human Services", Publicação do NIH N° 91-3242). A frase "região constante" se refere à porção da molécula do anticorpo que confere funções efetoras. Em trabalho anterior sobre a produção de anticorpos não imunogênicos para uso em terapia de doença humana, regiões constantes de camundongo foram substituídas por regiões constantes humanas. As regiões constantes dos anticorpos humanizados do indivíduo foram derivadas de imunoglobulinas humanas. No entanto, esses anticorpos humanizados ainda despertaram uma resposta imune indesejada e potencialmente perigosa em humanos, e houve perda de afinidade.

A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones e cols. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann e cols. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven e cols. (1988) *Science* 239:1.534-1.536), pela utilização de CDRs ou seqüências de CDR de roedor ou de roedor mutante como substituição para as seqüências correspondentes de um anticorpo humano. Veja também as Patentes U.S. N°s 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205; aqui incorporadas por

referência. Em alguns casos, os resíduos dentro das regiões estruturais de uma ou mais regiões variáveis da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes (veja, por exemplo, as Patentes 5 U.S. N°s 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370). Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo (por exemplo, 10 para obter a afinidade desejada). Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas, ou substancialmente todas, as regiões hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana, e 15 todas, ou substancialmente todas, as regiões estruturais são aquelas de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também irá compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina 20 humana. Para mais detalhes, veja Jones e cols. (1986) *Nature* 331:522-525; Riechmann e cols. (1988) *Nature* 332:323-329; e Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596; aqui incorporados por referência. Conseqüentemente, 25 tais anticorpos "humanizados" podem incluir anticorpos nos quais substancialmente menos de um domínio variável intacto humano foi substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e, possivelmente, alguns resíduos estruturais, são 30 substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos

de roedores. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. N°s 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Veja também a Patente U.S. N° 6.180.370, e a Publicação Internacional N° WO 01/27160, em que são discutidos 5 anticorpos humanizados e técnicas para a produção de anticorpos humanizados que melhoram a afinidade para um antígeno predeterminado

Anticorpos anti-CD40 humanizados também podem ser produzidos com o uso da tecnologia "Human Engineering™" 10 (Xoma Ltd., Berkeley, California).

Anticorpos monoclonais anti-CD40 humanizados incluem anticorpos como SGN-40 (Tai e cols. (2004) Cancer Res. 64:2846-52; Patente U.S. No. 6.838.261), que é a forma humanizada do anticorpo anti-CD40 murídeo SGN-14 (Francisco 15 e cols. (2000) Cancer Res. 60:3225-31), e o anticorpos revelado na Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 2004/0120948; aqui incorporados em sua totalidade por referência.

A presente invenção também pode ser praticada com o 20 uso de anticorpos xenogênicos produzidos em um hospedeiro mamífero não humano, mais particularmente um camundongo transgênico, caracterizados por loci endógenos inativados de imunoglobulina (Ig). Nessas animais transgênicos, genes endógenos competentes para a expressão de subunidades leves 25 e pesadas de imunoglobulinas do hospedeiro são tornadas não funcionais e substituídas com os loci análogos de imunoglobulina humana. Esses animais transgênicos produzem anticorpos humanos na ausência substancial de subunidades leves ou pesadas de imunoglobulina do hospedeiro. Veja, por 30 exemplo, Patentes U.S. N°s 5.877.397 e 5.939.598 aqui

incorporadas por referência.

Portanto, em algumas modalidades, anticorpos totalmente humanos para CD40, por exemplo, são obtidos pela imunização de camundongos transgênicos. Um desses 5 camundongo é obtido com o uso de tecnologia Xenocamundongo® (Abgenix; Fremont, Califórnia), e é revelado nas Patentes U.S. N°s 6.075.181, 6.091.001, e 6.114.598, todos aqui incorporados por referência. Por exemplo, para produzir o anticorpo CHIR-12.12, camundongos transgênicos para o lócus 10 da cadeia pesada de IgG₁ humana e para o lócus da cadeia leve κ humana foram imunizados com células Sf9 que expressam CD40 humano. Os camundongos também podem ser transgênicos para outros isótipos. Anticorpos anti-CD40 totalmente humanos úteis nos métodos da presente invenção 15 são caracterizados por propriedades de ligação similares àquelas exibidas pelo anticorpo monoclonal CHIR-12.12.

Como acima observado, o termo "anticorpo" como aqui usado também engloba fragmentos de anticorpo que podem se ligar a antígeno. "Fragmentos de anticorpos" compreendem 20 uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região de ligação de antígeno ou a região variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diabodies; anticorpos lineares (Zapata e cols. (1995) *Protein Eng.* 25 10:1,057); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo. A digestão com papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação de 30 antígeno e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete

sua habilidade para cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina gera um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois sítios de combinação de antígeno e ainda é capaz de entrecruzar o antígeno.

5 "Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de reconhecimento e de ligação de antígeno completo. Essa região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia leve e um de cadeia pesada em estreita associação não covalente. É nessa configuração que as três CDRs de
10 cada domínio variável interage para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, até mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv que compreenda
15 apenas três CDRs específicas para um antígeno) tem a habilidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, embora em uma afinidade menor do que todo o sítio de ligação.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Fragmentos Fab diferem de fragmentos Fab' pela adição de poucos resíduos no terminal carboxi do domínio C_{H1} de cadeia pesada que inclui uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui utilizada para Fab' em que o resíduo(s) de cisteína
25 dos domínios constantes abrigam um grupo tiol livre. Fragmentos Fab' são produzidos por redução da ponte de dissulfeto da cadeia pesada do fragmento $F(ab')_2$. Também são conhecidos outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo.

30 Fragmentos de um anticorpo anti-CD40 são adequados

para uso nos métodos da invenção desde que eles retenham a afinidade desejada do anticorpo de comprimento total. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 irá reter a capacidade de se ligar ao antígeno de CD40. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades similares ao anticorpo de comprimento total correspondente. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 antagonista de comprimento total será preferivelmente capaz de se ligar especificamente a um antígeno de CD40 humano expresso na superfície de uma célula humana, e é livre de atividade agonista significativa mas exibe atividade antagonista quando ligado a um antígeno de CD40 em uma célula que expressa CD40 humano. Tais fragmentos são aqui denominados fragmentos "de ligação de antígeno". Fragmentos de um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção irão reter preferivelmente a capacidade de se ligar a FcR ou FcRs relevantes. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 pode reter a capacidade de se ligar a FcγRIIIa. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 de comprimento total pode ser capaz de se ligar especificamente a um antígeno de CD40 de superfície celular, e também capaz de se ligara FcγRIIIa em células efetoras humanas, como células natural killer (NK). Tais fragmentos são aqui referidos como fragmentos de "ligação a FcR". Tais fragmento geralmente incluirão pelo menos parte do domínio constante da cadeia pesada.

Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, esses fragmentos eram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja, por exemplo, Morimoto e cols.

(1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan e cols. (1985) *Science* 229:81). No entanto, esses fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por 5 exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter e cols. (1992) 10 *Bio/Technology* 10:163-167). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente de uma cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o profissional experiente.

15 Fragmentos de ligação de antígeno adequados de um anticorpo compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a região de ligação de antígeno ou variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, sem limitação, fragmentos Fab, F(ab')₂ e 20 F_v e moléculas de anticorpo de cadeia única. Por "Fab" entende-se um fragmento monovalente de ligação de antígeno de uma imunoglobulina que é composto da cadeia leve e parte da cadeia pesada. Por F(ab')₂ entende-se um fragmento bivalente de ligação de antígeno de uma imunoglobulina que 25 contém tanto cadeias leves quanto parte de ambas as cadeias pesadas. Por "F_v de cadeia única" ou "sF_v" entende-se fragmentos que compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, nos quais esses domínios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. Veja, por exemplo, as Patentes 30 U.S. N°s 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 e 5.856.456, aqui

incorporadas por referência. Geralmente, o polipeptídeo Fv ainda comprehende um vinculador polipeptídico entre os domínios V_H e V_L que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão sobre 5 sFv, veja Pluckthun (1994) em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenburg e Moore (Springer-Verlag, Nova York), pp. 269-315. Fragmentos de ligação de antígeno dos anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui revelados também podem ser conjugados a uma citotoxina 10 para causar a morte de células-alvo como aqui descrito abaixo.

Em algumas modalidades da invenção, o anticorpo anti-CD40 é um anticorpo anti-CD40 antagonista. Quando tais anticorpos se ligam a CD40 apresentado na superfície de 15 células humanas, como células B humanas, eles não causam atividade agonista significativa. Em algumas modalidades, sua ligação a CD40 apresentada na superfície de células humanas resulta na inibição da proliferação e diferenciação dessas células humanas. Os anticorpos anti-CD40 adequados 20 para uso nos métodos da invenção incluem aqueles anticorpos que podem exibir atividade antagonista contra células humanas normais e malignas que expressam o antígeno CD40 de superfície celular.

Por "atividade agonista" entende-se que a substância 25 funciona como um agonista. Um agonista combina com um receptor em uma célula e inicia uma reação ou atividade que é similar ou igual àquela iniciada pelo ligante natural do receptor. Um agonista de CD40, como C4BP, induz qualquer uma ou todas, sem limitação, as seguintes respostas: 30 proliferação e/ou diferenciação de células B; supra-

regulação de adesão intercelular por meio de tais moléculas como ICAM-1, E-seletina, VCAM, e outras; secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF e outras; transdução de sinal através do receptor de 5 CD40 por tais vias como TRAF (por exemplo, TRAF2 e/ou TRAF3), MAP quinases como NIK (quinase indutora de NF-xB), I-kapa B quinases (IKK cc/(3), fator de transcrição NF-x.13, Ras e a via MEK/ERK, a via PI3K/AKT, a via P38 MAPK, e outras; transdução de um sinal anti-apoptótico por tais 10 moléculas como XIAP, mcl-1, bcl-x, e outras; geração de memória de célula B e/ou T; produção de anticorpo de célula B; troca de isotipo de célula B, supra-regulação de expressão de superfície celular de MHC Classe II eCD80/86, e outros.

15 Por atividade agonista "significativa" significa uma atividade agonista de pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, como medido em um ensaio de uma resposta 20 de célula B. Preferivelmente, atividade agonista "significativa" é um atividade agonista que é pelo menos 2 vezes maior ou pelo menos 3 vezes maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, como medido em um ensaio de uma resposta de 25 célula B. Desse modo, por exemplo, quando a resposta de célula B de interesse for proliferação de células B, atividade agonista "significativa" seria a indução de um nível de proliferação de células B que é pelo menos 2 vezes maior ou pelo menos 3 vezes maior do que o nível de 30 proliferação de células B induzido por uma substância

neutra ou por um controle negativo. Em uma modalidade, uma imunoglobulina inespecífica, por exemplo, IgG1, que não se liga a CD40, serve como controle negativo. Uma substância "livre de atividade agonista significativa" exibiria uma 5 atividade agonista de não mais que cerca de 25% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, preferivelmente no máximo cerca de 20% maior, 15% maior, 10% maior, 5% maior, 1% maior, 0,5% maior ou até mesmo no máximo cerca de 0,1% maior do que a 10 atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, como medido em um ensaio de resposta de célula B.

Por "atividade antagonista" entende-se que a substância funciona como um antagonista. Um anticorpo 15 antagonista anti-CD40 da invenção evita ou reduz a indução de qualquer uma das respostas induzidas por ligação do receptor de CD40 a um ligante do agonista, particularmente CD40L. Os antagonistas podem reduzir a indução de qualquer uma ou mais das respostas à ligação agonista em 5%, 10%, 20% 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferivelmente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mais preferivelmente 70%, 80%, 85% e, principalmente, 90%, 95%, 99% ou 100%. Métodos para a medida da especificidade de ligação de ligante de CD40 e atividade antagonista do agente terapêutico anti-CD40, por 25 exemplo, um anticorpo anti-CD40, são conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, ensaios-padrão de ligação competitiva, ensaios para monitoramento da secreção de imunoglobulina por células B, ensaios de proliferação de células B, ensaios de proliferação de células Banchereau- 30 Like-B, ensaios de célula T helper para a produção de

anticorpo, co-estimulação de ensaios de proliferação de células B e ensaios para supra-regulação de marcadores da ativação de célula B. Veja, por exemplo, tais ensaios revelados em WO 00/75348 e Patente U.S. No. 6.087.329, aqui 5 incorporados por referência. Veja também, WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294W0, cujos conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

10 Antagonista/ausência de atividade agonista pode ser avaliada por ensaios que mostram que CHIR-12.12 é desprovido de atividade agonista. Ensaios adequados são mostrados nos ensaios descritos em US 5677165 (Chiron Corporation).

15 Em uma modalidade da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40 é livre de atividade agonista significativa em uma resposta celular. Em outra modalidade da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40 é livre de atividade agonista significativa em ensaios de mais de uma resposta 20 celular (por exemplo, proliferação e diferenciação, ou proliferação, diferenciação e, para células B, produção de anticorpo).

De interesse particular são anticorpos anti-CD40 antagonistas que são livres de atividade agonista 25 significativa como aqui definido mas exibem atividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 em células B humanas. Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista é livre de atividade agonista significativa em uma resposta de célula B. Em uma outra 30 modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista é

é livre de atividade agonista significativa em ensaios de mais de uma resposta de célula B (por exemplo, proliferação e diferenciação, ou proliferação, diferenciação, e produção de anticorpo).

5 Qualquer um dos ensaios conhecidos na técnica pode ser usado para determinar se um anticorpo anti-CD40 age como um antagonista de uma ou mais respostas de célula B. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 age como um antagonista de pelo menos uma resposta de célula B
10 selecionada do grupo que consiste em proliferação de célula B, diferenciação de célula B, produção de anticorpo, adesão intercelular, geração de memória de célula B, troca de isotipo, supra-regulação de expressão de superfície celular de MHC Classe II e CD80/86, e secreção de citocinas pró-
15 inflamatórias como IL-8, IL-12, e TNF. De interesse particular são anticorpos antagonistas anti-CD40 que são livres de atividade agonista significativa com relação à proliferação de célula B quando ligados ao antígeno CD40 humano na superfície de uma célula B humana.

20 Nessa modalidade, o anticorpo anti-CD40 é um antagonista da proliferação de célula B induzida por CD40L solúvel ou de superfície celular, como medido em um ensaio de proliferação de célula B. Ensaios de proliferação de célula B adequados são conhecidos na técnica.
25 Preferivelmente, o anticorpo anti-CD40 antagonista estimula a proliferação de célula B em um nível que é de não mais que cerca de 25% maior que a proliferação de célula B induzida por uma substância neutra ou controle negativo, preferivelmente não mais que cerca de 20% maior, 15% maior,
30 10% maior, 5% maior, 1% maior, 0,5% maior, ou ainda não

mais que cerca de 0,1% maior que a proliferação de célula B induzida por uma substância neutra ou controle negativo.

Em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 é um antagonista de proliferação de célula B que é induzida por 5 um outro anticorpo anti-CD40, por exemplo, o anticorpo anti-CD40 S2C6, como medido em uma proliferação de célula B, e o nível de proliferação de célula B estimulado pelo outro anticorpo anti-CD40 na presença do anticorpo anti-CD40 antagonista é de não mais que cerca de 25% da 10 proliferação de célula B induzida pelo outro anticorpo anti-CD40 na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (ou seja, pelo menos 75% de inibição), preferivelmente não mais que cerca de 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, ou até mesmo 15 não mais que cerca de 0,1% da proliferação de célula B induzida pelo outro anticorpo anti-CD40 na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista.

Ainda em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 é um antagonista de proliferação de célula B que é induzida pela linha de células EL4B5 como medido em um ensaio de 20 ativação de célula B, e o nível de proliferação de célula B estimulado pela linha de células EL4B5 na presença do anticorpo anti-CD40 antagonista é de não mais que cerca de 25% da proliferação de célula B induzida por essa linha de células na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (ou 25 seja, pelo menos 75% de inibição), preferivelmente não mais que cerca de 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, ou ainda não mais que cerca de 0,1% da proliferação de célula B induzida por essa linha de células na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista.

30 Ainda em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 é

um antagonista da produção de anticorpos induzida por célula T humana por células B humanas como medido no ensaio de célula T helper humana para produção de anticorpo por células B. Desse modo, o nível de produção do anticorpo IgG, produção do anticorpo IgM, ou produção do anticorpo IgG e IgM por células B estimulada por células T na presença do anticorpo anti-CD40 antagonista é de não mais que cerca de 50% da produção do anticorpo respectivo por células B estimuladas por células T na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (ou seja, pelo menos 75% de inibição), preferivelmente não mais que cerca de 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, ou ainda não mais que cerca de 0,1% da produção do anticorpo respectivo por células B estimuladas por células T na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista. Anticorpos anti-CD40 antagonistas adicionais incluem os anticorpos monoclonais referidos como SD12, 3A8 and 3C6, que são secretado por um hibridoma que tem os números de acesso ATCC HB 11339, HB 12024 e HB 11340, respectivamente. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.315.998, aqui incorporada em sua totalidade por referência.

Anticorpos anti-CD40 antagonistas são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, o anticorpo anti-CD40 humano produzido pelo hibridoma designado F4-465 revelado nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. 20020142358 e 20030059427; aqui incorporados em sua totalidade por referência. F4-465 foi obtido de camundongo HAC (Kuroiwa e cols. (2000) Nature Biotech. 10:1086 (2000)) e portanto, expressa a cadeia leve humana lambda. Veja também, WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO

2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294WO, cujos conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

Além da atividade antagonista, o anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção terá preferivelmente um outro mecanismo de ação contra uma célula alvo. Por exemplo, o anticorpo anti-CD40 terá preferivelmente atividade de ADCC. Alternativamente, as 5 regiões variáveis do anticorpo anti-CD40 podem ser expressas em um outro isotipo de anticorpo que tem 10 atividade de ADCC. Também é possível conjugar formas nativas, formas recombinantes, ou fragmento de ligação a antígenos de anticorpos anti-CD40 a uma citotoxina, um agente terapêutico, ou um íon de metal radioativo ou 15 radioisótopo, como descrito em outra parte nessa.

Como explicado em outra parte nessa, os inventores fizeram o achado surpreendente que, ao contrário de outros anticorpos, anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, são capazes de mediar potente citotoxicidade celular dependente 20 de anticorpo (ADCC) de células alvo que expressam CD40 via ligação aos dois alótipos de Fc γ RIIIa de aminoácido 158 (V ou F) em células killer naturais (NK) de paciente humano. Portanto, anticorpos anti-CD40, como CHIR- 12.12, podem ser usados no tratamento de doenças 25 inflamatórias e doenças autoimunes associadas com células que expressam CD40 em pacientes humanos heterozigóticos ou homozigóticos para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), além de pacientes humanos homozigóticos para Fc γ RIIIa-158V (genótipo V/V). A presente invenção é especialmente 30 vantajosa para o tratamento de doenças inflamatórias e

doenças autoimunes que não são responsivas ao tratamento com rituximab (Rituxan®), porque a atividade clínica de rituximab em NHL não está correlacionada com o genótipo de FcγRIIIa do paciente.

5 Portanto, anticorpos anti-CD40 particularmente preferidos para uso nos métodos da presente invenção são aqueles que, além da atividade antagonista, são capazes de mediar ADCC de células que expressam CD40 por células efetoras humanas, como células killer naturais (células NK) 10 que expressam FcγRIIIa. Mais preferidos são aqueles anticorpos anti-CD40 que são capazes de se ligar a FcγRIIIa-158F e FcγRIIIa-158V com alta afinidade, como descrito também em outra parte nessa.

Anticorpos anti-CD40 particularmente preferidos são 15 aqueles revelados em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294WO, cujos conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

De particular interesse para a presente invenção são 20 anticorpos anti-CD40 antagonistas que partilha as características de ligação do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 descrito em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2007/053661 PCT/US2006/042601, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 25 2005/044294. Tais anticorpos incluem, sem limitação os seguintes:

- a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12;
- b) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12;
- 30 c) um anticorpo monoclonal que compreende uma

seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:2, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:4, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:5, ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. 5 N°:2 e Id. de Seq. N°:4, e ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:5;

d) um anticorpo monoclonal que tem uma seqüência de aminoácidos codificada pela molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionada do 10 grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:1, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:3, e ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:1 and Id. de Seq. N°:3;

e) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo 15 capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12;

f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende resíduos 82-87 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;

20 g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende resíduos 82-89 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;

h) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 em um ensaio de ligação 25 competitiva;

i) o anticorpo monoclonal do item a) ou um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores c)-h), em que o referido anticorpo é produzido de forma recombinante; e

30 j) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de

ligação a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores a)-i), em que o referido fragmento retém a capacidade de ligação específica ao referido antígeno CD40 humano.

5 O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 é particularmente preferido para uso nos métodos da presente invenção.

O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 foi descrito em detalhes em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 10 2005/044294. O anticorpo CHIR-12.12 é um anticorpo monoclonal anti-CD40 totalmente humano do isotipo IgG1 produzido a partir da linha de células de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (referida como a linha de células 12.12). A linha de células foi criada com o uso de 15 esplenócitos de camundongos xenotípicos imunizados contendo o lócus de cadeia pesada de IgG1 humana e o lócus de cadeia K. humana (tecnologia XenoCamundongo®; Abgenix; Fremont, California). As células do baço foram fundidas com as células de mieloma de camundongo SP2/0 (Sierra BioSource). 20 Os hibridomas resultantes foram subclonados várias vezes para criar a linha estável de células monoclonais 12.12. Outros anticorpos adequados para uso nos métodos da invenção podem ser preparados de modo similar com o uso de camundongos transgênicos para lócus de imunoglobulina 25 humana, como descrito em outra parte nessa.

O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 se liga a CD40 solúvel em ensaios de tipo ELISA, evita a ligação de ligante de CD40 a CD40 de superfície celular, e desloca o ligante de CD40 pré-ligado, como determinado por ensaios de 30 citometria de fluxo. Anticorpos CHIR 5.9 e CHIR-12.12

competem um com o outro por ligação a CD40 mas não com 15B8, o anticorpo anti-CD40 monoclonal descrito em Pedido Provisório U.S. No. de Série 60/237.556, intitulado "Human Anticorpos anti-CD40," depositado em 2 de outubro de 2000, 5 e Pedido Internacional PCT No. PCT/US01/30857, também intitulado "Human Anti-CD40 Antibodies," depositado em 2 de outubro de 2001 (Caso No. PP16092.003) e publicado como WO 2002/028904, ambos aqui incorporados em sua totalidade por referência. Quando testado *in vitro* para efeitos sobre a 10 proliferação de células B a partir de indivíduos humanos normais, CHIR-12.12 age como anticorpo anti-CD40 antagonista. Além disso, CHIR-12.12 não induz forte proliferação de linfócitos humanos a partir de indivíduos normais. O anticorpo é capaz de matar células alvo que 15 expressam CD40 por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). A afinidade de ligação de CHIR-12.12 por CD40 humano é 5×10^{-10} M, como determinado no ensaio Biacore™.

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos das 20 regiões variáveis do anticorpo são aqui fornecidas. mais particularmente, as seqüências de aminoácidos para as regiões líder, variável, e constante para a cadeia leve e cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 são apresentadas em Id. de Seq. N°:2 (seqüência completa para a cadeia leve de mAb 25 CHIR-12.12), Id. de Seq. N°:4 (seqüência completa para a cadeia pesada para mAb CHIR-12.12), e Id. de Seq. N°:5 (seqüência completa para a variante da cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 apresentada em Id. de Seq. N°:4, em que a variante compreende uma substituição de serina pelo resíduo 30 de alanina na posição 153 de Id. de Seq. N°:4). As

seqüências de nucleotídeos que codificam a cadeia leve e cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 são apresentadas em Id. de Seq. N°:1 (seqüência codificadora para a cadeia leve para mAb CHIR-12.12) e Id. de Seq. N°:3 (seqüência codificadora para a cadeia pesada para mAb CHIR-12.12). Hibridomas que expressam o anticorpo CHIR-12.12 foram depositados com a ATCC com a designação de depósito de patente de PTA-5543.

Anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção incluem anticorpos que diferem do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 mas que retêm as CDRs, e anticorpos com uma ou mais adições, deleções, ou substituições de aminoácidos. Os anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção também podem ser anticorpos desimunizados, particularmente anticorpos anti-CD40 antagonistas desimunizados, que podem ser produzidos como descrito, por exemplo, na Publicação Internacional Nos. WO 98/52976 e WO 0034317; aqui incorporadas por referência. Dessa forma, resíduos nos anticorpos anti-CD40 antagonistas da invenção são modificados de modo a tornar os anticorpos não ou menos imunogênicos a humanos embora retenham sua atividade antagonista para células humanas que expressam CD40, em que tal atividade é medida por ensaios mostrados em outra parte nessa. Também incluídas no escopo da presente invenção são proteínas de fusão que compreendem um anticorpo de interesse, por exemplo, um anticorpo anti-CD40 antagonista ou um anticorpo anti-CD40L antagonista, ou um fragmento desses, cujas proteínas de fusão podem ser sintetizadas ou expressas a partir de vetores de polinucleotídeos correspondentes, como é conhecido na

técnica. Tais proteínas de fusão são descritas com referência a conjugação de anticorpos como mostrados em outra parte nessa.

Qualquer anticorpo conhecido que tem a especificidade de ligação de interesse pode ter variações de seqüência produzidas com o uso de métodos descritos, por exemplo, nas Publicações de Patente Nos. EP 0983303 A1, WO 00/34317, e WO 98/52976, aqui incorporadas por referência. Por exemplo, foi mostrado que as seqüências na CDR podem fazer um anticorpo se ligar a MHC Classe II e despertar uma resposta de célula T helper indesejada. Uma substituição conservadora pode permitir que o anticorpo retenha a atividade de ligação, embora perca sua habilidade para desencadear uma resposta indesejada de célula T. Qualquer uma dessas substituições conservadoras ou não conservadoras pode ser feita usando métodos reconhecidos na técnica, tais como aqueles aqui apresentados em outra seção, e os anticorpos resultantes também podem ser usados nos métodos da presente invenção. Os anticorpos variantes podem ser testados rotineiramente quanto à atividade antagonista, por exemplo, atividade antagonista, afinidade e especificidade utilizando-se os métodos aqui descritos.

Por exemplo, variantes de seqüência de aminoácidos de um anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, podem ser preparadas por mutações na seqüência de DNA clonado que codifica o anticorpo de interesse. Métodos para mutagênese e alterações nas seqüência de nucleotídeos são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. 30 (1983) "Techniques in Molecular Biology" (MacMillan

Publishing Company, Nova York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel e cols. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367; Sambrook e cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nova York); Patente U.S. Nº 4.873.192; e as referências nela citadas; aqui incorporados por referência. Um guia sobre como adequar substituições de aminoácidos que não afetem a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrado no modelo de Dayhoff e cols. (1978) no *Atlas of Protein Sequence e Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado por referência. Substituições conservadoras como, por exemplo, a troca de um aminoácido com outro que possui propriedades similares, podem ser preferidas. Exemplos de substituições conservadoras incluem, sem limitação, Gly<=>Ala, Val<=>Ile<=>Leu, Asp<=>Glu, Lys<=>Arg, Asn<=>Gln e Phe<=>Trp<=>Tyr.

Na construção de variantes de um anticorpo de interesse, por exemplo, um polipeptídeo de anticorpo anti-CD40 são feitas modificações de tal forma que as variantes continuem a possuir a atividade desejada, ou seja, afinidade de ligação similar, e, no caso de anticorpos anti-CD40 antagonista, que sejam capazes de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso na superfície de uma célula humana, e sendo livres de atividade agonista significativa, mas exibam atividade antagonista quando ligadas a um antígeno CD40 em uma célula que expressa CD40 humano. Obviamente, quaisquer mutações feitas no DNA que codifica o polipeptídeo variante não devem colocar a seqüência fora do quadro de leitura e,

preferivelmente, não criarão regiões complementares que possam produzir estrutura de mRNA secundária. Veja a Publicação de Pedido de Patente EP N° 75.444.

Além disso, a região constante de um anticorpo, por exemplo, um anticorpo anti-CD40 antagonista pode ser mutada para alterar a função efetora de diversas formas. Por exemplo, consulte a Patente U.S. N° 6.737.056 B1 e a Publicação do Pedido de Patente U.S. N° 2004/0132101 A1, que revela mutações Fc que otimizam a ligação de anticorpo aos receptores Fc.

Preferivelmente, variantes de um anticorpo de referência, por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CD40 têm seqüências de aminoácidos que possuem pelo menos 70% ou 75% de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de seqüência para seqüência de aminoácidos para a molécula de anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 aqui descrito, ou a uma porção mais curta da molécula de anticorpo de referência. Mais preferivelmente, as moléculas compartilham pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência. Para as finalidades da presente invenção, o percentual de identidade de seqüência é determinado usando o algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman usando uma pesquisa de espaços afins com uma penalidade de espaço aberto de 12 e uma penalidade de extensão de espaço de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é ensinado em Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Uma variante pode, por exemplo, diferir do

do anticorpo de referência, por exemplo, anticorpo antagonista anti-CD40 por apenas 1 a 15 resíduos de aminoácidos, apenas 1 a 10 resíduos de aminoácidos como, por exemplo, 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2 ou até mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Com relação ao alinhamento ótimo de duas seqüências de aminoácidos, o segmento contíguo da seqüência de aminoácidos variante pode ter resíduos de aminoácidos adicionais ou resíduos de aminoácidos deletados com relação à seqüência de aminoácidos de referência. O segmento contíguo usado para comparação com a seqüência de aminoácidos de referência incluirá pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, e pode ter 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácidos. Podem ser feitas correções para a identidade de seqüência associadas às substituições conservadoras ou espaços de resíduos (veja algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman).

A estrutura química precisa de um polipeptídeo capaz de se ligar especificamente ao CD40 e que retém atividade antagonista, particularmente quando ligado ao antígeno CD40 em células alvo, depende de diversos fatores. Como grupos amino e carboxil ionizáveis estão presentes na molécula, um polipeptídeo específico pode ser obtido como um sal ácido ou básico ou em forma neutral. Todas essas preparações que retêm sua atividade biológica quando colocadas em condições ambientais adequadas estão incluídas na definição de anticorpos antagonistas anti-CD40 como aqui usada. Além disso, a seqüência de aminoácidos primária do polipeptídeo pode ser aumentada por derivação usando porções de açúcar (glycosilação) ou por outras moléculas suplementares, tais

como lipídeos, fosfato, grupos acetil e semelhantes. Ela também pode ser aumentada por conjugação com sacarídeos. Certos aspectos desse aumento são obtidos através de sistemas de processamento pós-tradução do hospedeiro 5 produtor; outras dessas modificações podem ser introduzidas *in vitro*. Em qualquer evento, tais modificações estão incluídas na definição de um anticorpo anti-CD40 aqui usada, desde que as propriedades antagonistas do anticorpo anti-CD40 não sejam destruídas. Espera-se que tais 10 modificações possam afetar quantitativa ou qualitativamente a atividade, aumentando ou diminuindo a atividade do polipeptídeo, nos vários ensaios. Além disso, resíduos de aminoácidos individuais na cadeia podem ser modificados por oxidação, redução ou outra derivação, e o polipeptídeo pode 15 ser clivado para a obtenção de fragmentos que retenham atividade. Tais alterações que não destroem a atividade antagonista não removem a seqüência de polipeptídeos da definição de anticorpos anti-CD40 de interesse como aqui usada.

20 A técnica fornece uma diretriz substancial em relação à preparação e ao uso de variantes de polipeptídeo. Na preparação das variantes do anticorpo anti-CD40, aqueles habilitados na técnica podem determinar prontamente quais modificações ao nucleotídeo ou à seqüência nativa de 25 aminoácidos resultarão em uma variante que seja adequada para uso como um componente terapeuticamente ativo de uma composição farmacêutica usada nos métodos da presente invenção.

O anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção 30 preferivelmente possui pelo menos uma das seguintes

atividades biológicas *in vitro* e/ou *in vivo*: inibição da secreção de imunoglobulina por células B periféricas humanas normais estimulada por células T; inibição da sobrevida e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimulada por células que expressam CD40L ou ligante de CD40 solúvel (sCD40L); inibição da sobrevida e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimulada por células T de Jurkat; inibição de sinais intracelulares antiapoptóticos de "sobrevida" em qualquer célula estimulada por sCD40L ou CD40L de fase sólida; e inibição da transmissão do sinal de CD40 em qualquer célula mediante ligação com sCD40L ou CD40L de fase sólida, anergyia e/ou indução de tolerância de células alvo que portam CD40 ou células que portam ligantes cognatos para CD40 incluindo, sem limitação, células T e células B, indução da expansão ou ativação de células T reguladoras CD4+CD25+ (veja, por exemplo, rejeição de tecido específica para aloantígeno de doador via interferência CD40-CD40L, van Maurik e cols. (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404), citotoxicidade via qualquer mecanismo (incluindo, sem limitação, citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC), infra-regulação da proliferação, e/ou apoptose em células alvo), modulação da secreção de citocina de célula alvo e/ou expressão de molécula de superfície celular, e combinações desses.

Ensaios para tais atividades biológicas podem ser realizados como aqui descrito em pedidos provisórios intitulados "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*", depositado em 4 de novembro de

2003, 26 de novembro de 2003 e 27 de abril de 2004, e
Pedidos de Patente U.S. designados N°s 60/517.337 (Processo
Nº PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (Processo Nº
PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (Processo Nº
5 PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, e Pedido de
Patente Internacional Nº PCT/US2004/037152 (Processo Nº
PP20107.004 (035784/282916)), publicado como WO
2005/044854, também intitulado "*Antagonist Anti-CD40
Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*",
10 depositado em 4 de novembro de 2004; cujos conteúdos são
aqui incorporada em sua totalidade por referência. Veja
também os ensaios descritos em Schultze e cols. (1998)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton e cols.
(1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans e cols. (2000) J
15 Immunol. 164:688697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl.
49:17-22; Lederman e cols. (1996) Curr. Opin. Hematol.
3:77-86; Coligan e cols. (1991) Current Protocols in
Immunology 13:12; Kwekkeboom e cols. (1993) Immunology
79:439-444; e Patentes U.S. N°s 5.674.492 e 5.847.082, aqui
20 incorporadas por referência.

Um ensaio representativo para detectar anticorpos
antagonistas anti-CD40 específicos para os epitopos de
antígeno CD40 aqui identificados é um "ensaio competitivo
de ligação". Ensaios competitivos de ligação são ensaios
25 sorológicos nos quais desconhecidos são detectados e
quantificados quanto à sua habilidade para inibir a ligação
de um ligante conhecido rotulado ao seu anticorpo
específico. Esse também é denominado ensaio competitivo de
inibição. Em um ensaio competitivo de ligação
30 representativo, polipeptídeo CD40 rotulado é precipitado

por anticorpos candidatos em uma amostra, por exemplo, em combinação com anticorpos monoclonais despertados contra um ou mais epitopos dos anticorpos monoclonais da invenção. Anticorpos Anti-CD40 que reagem especificamente com um 5 epitopo de interesse podem ser identificados por rastreamento de uma série de anticorpos preparados contra uma proteína CD40 ou fragmento da proteína que compreende o epitopo particular da proteína CD40 de interesse. Por exemplo, para CD40 humano, epitopos de interesse incluem 10 epitopos que compreendem resíduos de aminoácidos lineares e/ou não lineares da isoforma curta de CD40 humano (veja N° de Acesso no GenBank NP 690593) apresentada em Id. de Seq. N°:10, codificada pela seqüência apresentada em Id. de Seq. N°:9; (veja, também No. de Acesso GenBank NM 152854), ou da 15 isoforma longa de CD40 humano (veja N°s de Acesso no GenBank CAA43045 e NP_001241, apresentada em Id. de Seq. N°:12, codificada pela seqüência apresentada em Id. de Seq. N°:11; veja, GenBank Nos. de Acesso X60592 e NM 001250). Alternativamente, ensaios competitivos de ligação com 20 anticorpos antagonistas anti-CD40 identificados previamente adequados poderiam ser usados para selecionar anticorpos monoclonais comparáveis aos anticorpos identificados previamente.

Anticorpos empregados em tais imunoensaios podem ser 25 rotulados ou não rotulados. Anticorpos não rotulados podem ser empregados em aglutinação; anticorpos rotulados podem ser empregados em uma ampla variedade de ensaios, que empregam uma ampla variedade de rótulos. A detecção da formação de um complexo antígeno-anticorpo entre um 30 anticorpo anti-CD40 e um epitopo de interesse pode ser

facilitada pela anexação de uma substância detectável ao anticorpo. Meios de detecção adequados incluem a utilização de rótulos, tais como radionuclídeos, enzimas, coenzimas, substâncias fluorescentes, substâncias quimioluminescentes, 5 cromógenos, substratos ou co-fatores de enzimas, inibidores de enzimas, complexos de grupo prostético, radicais livres, partículas, corantes, e semelhantes. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos 10 de complexos de grupo prostético adequados incluem estreptavidinibiotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou 15 ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente é luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H . Tais reagentes rotulados podem ser usados em diversos ensaios 20 bem conhecidos, tais como radioimunoensaios, imunoensaios enzimáticos, por exemplo, ELISA, imunoensaios fluorescentes, e semelhantes. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. Nós 3.766.162, 3.791.932, 3.817.837 e 25 4.233.402.

25 É também possível construir um anticorpo para ter atividade de ADCC aumentada. Em particular, a metade de terminal carboxi do domínio CH_2 é crítica para ADCC mediada através do receptor FcRIII. Uma vez que CH_2 e regiões de dobradiça têm um importante papel em funções efetoras, uma 30 séries de anticorpos de domínios múltiplos que contêm CH_2

extra e/ou regiões de dobradiça pode ser criada e investigada para quaisquer mudanças na potência efetora (veja, Greenwood, J., Gorman, S. D., Routledge, POR EXEMPLO, Lloyd, I.S. & Waldmann , H., Ther Immunol. 1994 5 Oct;1(5):247-55). Uma abordagem alternativa pode ser a construção de domínios extra em paralelo, por exemplo, através da criação de dímeros por construção de uma cisteína na cadeia H de uma Ig quimérica (veja, Shope B. (1992) J. Immunol. 1992 1; 148(9): 2918-22). Além disso, 10 mudanças para aumentar a atividade de ADCC podem ser construídas por introdução de mutações na região Fc (veja, por exemplo, US 6.737.056 B1), que expressa células em linhas de células deficientes de fucosil transferase (veja, for exemplo, US2003/0115614), ou efetuando outras mudanças 15 para a glicosilação do anticorpo (veja, por exemplo, US 6.602.684).

A presente invenção é especialmente vantajosa para o tratamento de doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas com células que expressam CD20, 20 particularmente em pacientes resistentes a Rituxan®, mais particularmente naqueles que são heterozigóticos ou homozigóticos para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F).

Como aqui usado, "anticorpo anti-CD20" engloba qualquer anticorpo que reconheça especificamente o antígeno 25 de superfície celular CD20, incluindo anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia única, e fragmentos desses como Fab, F(ab')₂, Fv, e outros fragmentos que retêm a função de ligação de antígeno do anticorpo anti-CD20 parente. De interesse particular junto 30 com os métodos da presente invenção são anticorpos anti-

CD20 ou fragmentos de ligação a antígeno desses que têm as propriedades de ligação exibidas pelo anticorpo monoclonal IDEC-C2B8 (Biogen IDEC Inc., Cambridge, MA).

Em algumas modalidades, o anticorpos anti-CD40 usado nos métodos da invenção exibe atividade terapêutica mais potente que o anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico IDEC-C2B8, em que a atividade terapêutica é avaliada com quantidades equivalentes desses anticorpos em um modelo experimental adequado. IDECC2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; comercialmente disponível sob o nome comercial Rituxan®, também referido como rituximab) é um anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico que contém IgG1 humana e regiões constantes kappa com regiões variáveis de murídeo isoladas de um anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, IDEC-2B8 (Reff e cols. (1994) Blood 83:435-445). Rituximab é licenciado para o tratamento de linfoma de célula B de baixo grau em recidiva ou linfoma não Hodgkin folicular (NHL), e está em experimentos clínicos para doenças autoimunes. A descoberta de anticorpos com atividade terapêutica superior comparados a rituximab pode melhorar drasticamente os métodos de terapia para doenças inflamatórias e doenças autoimunes.

Existem modelos adequados para testar a atividade em lúpus eritematoso disseminado (SLE), esclerose múltipla, inflamação e aterosclerose, transplante, e doença de Alzheimer como descrito abaixo.

Por exemplo, para testar a eficácia em lúpus eritematoso disseminado humano (LED) em que células mononucleares de sangue periférico (PMBCs) de pacientes com LED são enxertadas em camundongos SCID. Veja, por exemplo,

o modelo descrito em Duchosal e cols. (1990).1 Exp. Med. 172:985-8. Após transferência de PBMCs de pacientes com LED em camundongos SCID, é determinado se o tratamento influencia ou não a resposta de linfócito T à produção de 5 auto-antígeno e auto-anticorpo e manifestações de doença como glomerulonefrite.

Encefalite autoimune experimental de macaco Marmoset (EAE) é um modelo para esclerose múltipla humana. Veja, por exemplo, o modelo descrito em Raine e cols. (1999) Ann. 10 Neurol. 46:144-60 e Hart e cols. (2004) Lancet Neurol. 3:588-97.

O anticorpos pode ser testado *in vitro* para sua capacidade de inibir a produção induzida por CD40L de enzimas de degradação de matriz, expressão de fator 15 tecidual, citocinas pró-inflamatórias e supra-regulação de moléculas de adesão. Estudos subsequentes testam a capacidade dos anticorpos de mostrar as atividades antiinflamatórias *in vivo* com o uso de camundongos transgênicos que expressam CD40 humano e/ou moléculas de 20 CD20. Veja, por exemplo, o modelo descrito em Yasui (2002) Int. Immunol. 14:319-29.

Os anticorpos podem ser testados para sua capacidade de evitar a rejeição a transplantes em modelos de primatas não humanos. Receptores de aloenxerto renal de macaco 25 Cynomolgus são tratados com anticorpo para demonstrar o efeito sobre a aceitação de enxerto com ou sem medicamentos imunossupressores adicionais como ciclosporina, FK506, rapamicina, corticosteróides, CTLA4-Ig, e anticorpo anti-estimulante de linfócito B, e outros. Veja, por exemplo, o 30 modelo descrito em Wee e cols. (1992) Transplantation

53:501-7.

Para doença de Alzheimer, o anticorpos pode ser testado primeiramente *in vitro* para sua capacidade de bloquear a ativação da microglia. Estudos de eficácia *in vivo* com o anticorpos podem ser conduzidos em camundongos duplamente transgênicos que expressam CD40 e/ou CD20 humano e produzem peptídeo beta amilóide. Veja, por exemplo, o modelo descrito em Tan e cols. (2002) Nat. Neurosci. 5:1288-93.

10 Por "quantidade equivalente" do anticorpo anti-CD40 da invenção e Rituxan® entende-se que a mesma dose ou dose menor em mg é administrada com base no peso.

Portanto, quando o anticorpo anti-CD40 é dosado a 0,01 mg/kg de peso corporal do camundongo usado no modelo, 15 Rituxan® é também dosado a 0,01 mg/kg de peso corporal do camundongo. De modo similar, quando o anticorpo anti-CD40 é dosado a 0,1, 1, ou 10 mg/kg de peso corporal do camundongo usado no modelo, o Rituxan® é também dosado a 0,1, 1, ou 10 mg/kg, respectivamente, do peso corporal do camundongo.

20 Uma outra diferença na eficácia do anticorpo é a medição *in vitro* da concentração de anticorpo necessária para obter a lise máxima de células alvo *in vitro* na presença de células NK. Por exemplo, o anticorpos anti-CD40 da invenção atinge lise máxima de células Daudi em uma EC₅₀ de menos que 1/2, e preferivelmente 1/4, e mais preferivelmente, 1/10 da concentração de Rituxan®. Esse tipo de medição é também descrita nos Exemplos nessa.

30 Anticorpos anti-CD40 que se beneficiam de ter eficácia significativamente maior que quantidades equivalentes de Rituxan® nos ensaios acima descritos podem incluir:

- a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12;
- b) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12;
- c) um anticorpo monoclonal que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:2, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:4, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:5, ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:4, e ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:5;
- d) um anticorpo monoclonal que tem uma seqüência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:1, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°: 3, e ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°: 1 e Id. de Seq. N°: 3;
- e) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12;
- f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende resíduos 82-87 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;
- g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende resíduos 82-89 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;
- h) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 em um ensaio de ligação competitiva;
- i) o anticorpo monoclonal do item a) ou um anticorpo

monoclonal de qualquer um dos itens anteriores c)-h), em que o referido anticorpo é produzido de forma recombinante; e

j) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores a)-i), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

A presente invenção fornece um método para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40, que compreende:

a) a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40; e

b) determinação do referido genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano (V/V, V/F or F/F);

em que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é tratável com anticorpo anti-CD40 se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa 158F (genótipo V/F ou F/F). A doença inflamatória ou doença autoimune pode ser refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®).

Uma vez que um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40 foi identificado, aquele paciente humano pode ser então tratado com um anticorpo anti-CD40. Assim, o método pode incluir a etapa adicional de (c) administração a um paciente humano identificado como heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F) de

uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

Esse método de identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40 pode ser facilmente realizado por uma pessoa habilitada na técnica com o uso de um kit diagnóstico adequado. O kit deve compreender reagentes adequados para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Portanto, a invenção também fornece um kit para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40, que compreende reagentes para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Kits adequados são descritos em maiores detalhes em outra parte nessa.

A invenção também fornece um método para seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune, que compreende:

(a) a identificação de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40; e

(b) determinação do referido genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano (VN, V/F ou F/F),

em que se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento da referida doença inflamatória ou doença autoimune. A doença inflamatória ou doença autoimune pode ser refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®).

Uma vez que uma terapia com anticorpo anti-CD40 para tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune foi selecionado, aquele paciente humano pode ser então tratado com um anticorpo 5 anti-CD40. Portanto, o método pode incluir a etapa adicional de (c) administração a um paciente humano identificado como heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F) de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo 10 anti-CD40.

Esse método de seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune também pode ser facilmente realizado por uma pessoa habilitada na técnica com o uso de 15 um kit diagnóstico adequado. O kit deve compreender reagentes adequados para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Portanto, a invenção também fornece um kit para a seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem uma 20 doença inflamatória ou doença autoimune associada com células que expressam CD40, que compreende reagentes para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de paciente humano.

Por "tratável com um anticorpo anti-CD40" entende-se 25 que o paciente humano (ou seja, um indivíduo com uma doença inflamatória ou doença autoimune), quando tratado com o anticorpo anti-CD40, deve se beneficiar de uma "resposta terapêutica positiva" (como definido em outra parte nessa) 30 com relação à doença inflamatória ou autoimune doença para qual o tratamento é pensado.

Qualquer método para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano que usa uma amostra biológica obtida do paciente humano é contemplado.

Por exemplo, a invenção fornece um kit para uso na determinação do genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano, que inclui um microarranjo que compreende pelo menos um marcador de 10 ou mais nucleotídeos de comprimento e de uma seqüência adequada para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. RNA ou DNA rotulado é hibridizado a marcadores complementares no arranjo e então detectados por rastreamento de laser. As intensidades de hibridização para cada marcador no arranjo são determinadas e convertidas a um valor quantitativo que representa níveis de expressão relativos do gene. A seleção de seqüências de marcador e comprimentos pode ser facilmente realizada por pessoa habilitada. A seqüência de nucleotídeos s que codificam os alótipos de Fc γ RIIIa-158 F e V é conhecida. Portanto, a pessoa habilitada pode selecionar marcadores que, sob as condições experimentais adequadas, permitam a determinação do genótipo Fc γ RIIIa-158 das seqüências alvo.

Técnicas para a síntese desses arranjos que usam métodos de síntese mecânica são descritos, por exemplo, na Patente U.S. No. 5.384.261, aqui incorporada em sua totalidade por referência. Embora uma superfície de arranjo a plana seja preferida, o arranjo pode ser fabricado em uma superfície virtualmente de qualquer formato ou até mesmo em várias superfícies.

Os arranjos podem ser peptídeos ou ácidos nucleicos em glóbulos, géis, superfícies poliméricas, fibras como fibras

óticas, vidro ou qualquer outro substrato adequado, veja, Patentes U.S. Nos. 5.770.358, 5.789.162, 5.708.153, 6.040.193 e 5.800.992, cada uma dessas é aqui incorporada em sua totalidade para todos os objetivos. Os arranjos 5 podem ser embalados em uma tal forma que permita o diagnóstico ou outra manipulação de um dispositivo completo. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.856.174 e 5.922.591, aqui incorporadas por referência.

Por exemplo, a invenção também fornece um kit para uso 10 na determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano, que compreende oligonucleotídeos adequados para uso como iniciadores em amplificação catalisada por polimerase da região do gene ou mRNA que codifica amino ácido 158 de Fc γ RIIIa. A seleção das seqüências do iniciador e 15 comprimentos pode ser facilmente realizada por pessoa habilitada. A seqüência de nucleotídeos do gene e mRNA humano que codifica os alótipos de Fc γ RIIIa-158 F e V é conhecida. Portanto, a pessoa habilitada pode selecionar marcadores que, sob as condições experimentais adequadas, 20 permitam a amplificação da região do gene ou mRNA que codifica o aminoácido 158 de Fc γ RIIIa. A seqüência amplificada pode ser então seqüenciada com o uso de métodos conhecidos para determinar genótipo Fc γ RIIIa-158 do paciente.

25 Um outro método para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano é o uso de um método baseado em ácido nucleico que detecta fragmentação de DNA que é característica do genótipo Fc γ RIIIa-158 do paciente humano's. Quando do uso de eletroforese em géis de agarose, 30 DNA de cada genótipo de Fc γ RIIIa-158 tem um padrão

característico. Portanto, a invenção também fornece um kit para uso na determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano, que compreende uma ou mais enzimas de restrição adequadas para a determinação de um genótipo 5 Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. Enzimas de restrição adequadas são conhecidas na técnica (por exemplo, veja, Koene e cols., Blood, 1997, Vol. 90, No. 3, p. 1109-1114).

Os kits da invenção também podem incluir instruções que indicam como usar o kit para a determinação de um 10 genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano. O kit também pode compreender, por exemplo, um agente de tamponamento, um conservante, ou um agente de estabilização de proteína. Cada componente do kit pode comumente colocado em um recipiente individual, e todos os vários recipientes estão 15 em um único pacote junto com instruções que indicam como usar o kit para a determinação de um genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano.

A invenção fornece o uso de anticorpos anti-CD40 na manufatura de medicamentos para o tratamento de uma doença 20 inflamatória ou doença autoimune associada com células que expressam CD40, como descrito em outra parte nessa.

Os anticorpos anti-CD40 dessa invenção são administrados em uma concentração que é terapeuticamente eficaz para evitar ou tratar uma doença inflamatória ou 25 doença autoimune associada com células que expressam CD40. Para atingir esse objetivo, os anticorpos podem ser formulados usando diversos veículos e/ou excipientes aceitáveis conhecidos na técnica. O anticorpo anti-CD40 pode ser administrado por uma via de administração 30 parenteral. Tipicamente, os anticorpos são administrados

por injeção, por via tanto intravenosa quanto subcutânea. Métodos para se obter essa administração são conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

A administração intravenosa ocorre preferivelmente por infusão ao longo de um período de cerca de meia hora a 1 hora a cerca de 10 horas (menos que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 horas). As infusões subseqüentes podem ser administradas ao longo de um período de cerca de 1 a cerca de 6 horas, incluindo, por exemplo, cerca de 1 a cerca de 4 horas, cerca de 1 a cerca de 3 horas ou cerca de 1 a cerca de 2 horas ou menos que uma hora. Alternativamente, um anticorpo anti-CD40 como CHIR-12.12 pode ser administrado por via subcutânea.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com sua via de administração desejada. Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril como água para injeção, solução de soro fisiológico; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes, como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes, tais como ácido etilenodiaminatetraacético; tampões, tais como acetatos, citratos ou fosfatos, e agentes para o ajuste da tonicidade, tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser embalada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico.

Os anticorpos anti-CD40 são fornecidos tipicamente por técnica-padrão dentro de um tampão farmaceuticamente

aceitável, por exemplo, soro fisiológico estéril, água tamponada estéril, combinações dos anteriores etc. Métodos para a preparação de agentes administráveis por via parenteral são descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), aqui incorporado por referência. Veja também, por exemplo, a Publicação Internacional N° WO 98/56418, que descreve formulações farmacêuticas estabilizadas de anticorpo adequadas para uso nos métodos da presente invenção.

A quantidade de pelo menos um anticorpo anti-CD40 a ser administrada é facilmente determinada por aqueles habilitados na técnica sem experimentação desnecessária. Fatores que influenciam o modo de administração e a respectiva quantidade de pelo menos um anticorpo anti-CD40 incluem, sem limitação, a severidade da doença, a história da doença, a idade, peso, altura, saúde e condição física do indivíduo submetido à terapia. Da mesma forma, a quantidade de anticorpo anti-CD40 a ser administrada, dependerá do modo de administração e de se o indivíduo será submetido a uma dose única ou a múltiplas doses desse agente antitumoral. Geralmente, uma dosagem maior de anticorpo anti-CD40 será preferida com peso crescente do indivíduo que se submete à terapia.

A dose of anticorpo anti-CD40 a ser administrada está na faixa de cerca de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de

3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, ou de cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg/kg.

5 Portanto, por exemplo, a dose pode ser 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, ou 50 mg/kg, ou outras doses dentro da faixa de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 50
10 mg/kg.

O tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo pode incluir um tratamento único ou, preferivelmente, pode incluir uma série de tratamentos. Portanto, Em outra modalidade da 15 invenção, o método compreende a administração de múltiplas doses de anticorpo anti-CD40. O método pode compreender a administração de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, ou mais doses terapeuticamente eficazes de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti- 20 CD40. A freqüência e duração da administração de múltiplas doses das composições farmacêuticas que compreendem anticorpo anti-CD40 pode ser facilmente determinada por pessoa habilitada na técnica sem experimentação indevida. A mesma dose terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti- 25 CD40 pode ser administrada pela duração de um período de tratamento. Alternativamente, diferentes doses terapeuticamente eficazes de um anticorpo anti-CD40 podem ser usadas pela duração de um período de tratamento.

Em um exemplo preferido, um indivíduo é tratado com 30 anticorpo anti-CD40, na faixa entre cerca de 0,1 a 20 mg/kg

de peso corporal, uma vez por semana, por cerca de 1 a 10 semanas, preferivelmente entre cerca de 2 a 8 semanas, mais preferivelmente entre cerca de 3 a 7 semanas e, ainda mais preferivelmente, por cerca de 4, 5 ou 6 semanas. O tratamento pode ocorrer anualmente para a prevenção de recidivas, ou mediante uma indicação de recidiva. Será também observado que a dosagem eficaz de anticorpo usada para tratamento pode aumentar ou diminuir ao longo de uma série de tratamento em particular. Alterações na dosagem podem resultar e se tornar aparentes a partir dos resultados de ensaios diagnósticos, como aqui descrito.

Portanto, em uma modalidade, o regime de dosagem inclui uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 nos dias 1, 8, 15 e 22 de um período de tratamento. Em outra modalidade, o regime de dosagem inclui um regime de dosagem que tem uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 diariamente ou nos dias 1, 3, 5 e 7 de uma semana em um período de tratamento; um regime de dosagem que inclui uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 nos dias 1 e 3-4 de uma semana em uma período de tratamento; e um regime de dosagem preferido que incluir uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 no dia 1 de uma semana em uma período de tratamento. O período de tratamento pode compreender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, um mês, 2 meses, 3 meses, 6 meses, ou um ano. Os períodos de tratamento podem ser subsequentes ou separados um do outro por uma semana, 2

semanas, um mês, 3 meses, 6 meses, ou um ano.

Em outras modalidades, a dose terapeuticamente eficaz inicial de um anticorpo anti-CD40 como aqui definida em outra seção, pode estar na faixa de dosagem mais baixa (ou seja, cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg) com doses subseqüentes se situando dentro da faixa de dosagem mais elevada (ou seja, de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg).

Em modalidades alternativas, a dose terapeuticamente eficaz inicial de um anticorpo anti-CD40 como aqui definida em outra seção, pode estar na faixa de dosagem mais alta (ou seja, cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg) com doses subseqüentes se situando dentro da faixa de dosagem mais baixa (ou seja, de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg). Portanto, em algumas modalidades da invenção, a terapia com anticorpo anti-CD40 é iniciada pela administração de uma "dose de ataque" do anticorpo ao indivíduo que necessita de terapia. Por "cose de ataque" entende-se uma dose inicial do anticorpo anti-CD40 que é administrada ao indivíduo, em que a dose do anticorpo administrada se situa dentro da faixa de dosagem mais elevada (ou seja, de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg). A "dose de ataque" pode ser administrada como uma administração única, por exemplo, uma infusão única na qual o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno deste é administrado IV, ou como administrações múltiplas, por exemplo, infusões múltiplas nas quais o anticorpo é administrado IV, desde que a "dose de ataque" completa seja administrada aproximadamente dentro de um período de 24 horas. Após a administração da "dose de ataque", o

indivíduo recebe então uma ou mais doses terapeuticamente eficazes adicionais do anticorpo antagonista anti-CD40. Doses terapeuticamente eficazes subseqüentes podem ser administradas, por exemplo, de acordo com um esquema de 5 dosagem semanal, ou uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas. Nessas modalidades, as doses terapeuticamente eficazes subseqüentes geralmente se situam dentro da faixa de dosagem mais baixa (ou seja, 0,003 mg/kg a cerca de 20 10 mg/kg).

Alternativamente, em algumas modalidades, após a "dose de ataque", as doses terapeuticamente eficazes subseqüentes do anticorpo anti-CD40 são administradas de acordo com um "esquema de manutenção", no qual a dose terapeuticamente eficaz do anticorpo é administrada uma vez ao mês, uma vez a cada 6 semanas, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada 10 semanas, uma vez a cada três meses, uma vez a cada 14 semanas, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada 18 semanas, uma vez a cada cinco meses, uma vez a cada 22 semanas, uma vez a cada seis meses, uma vez a cada 7 meses, uma vez a cada 8 meses, uma vez a cada 9 meses, uma vez a cada 10 meses, uma vez a cada 11 meses ou uma vez a cada 12 meses. Nessas modalidades, as doses terapeuticamente eficazes do anticorpo anti-CD40 se situam dentro da faixa 20 de dosagem mais baixa (ou seja, 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg), particularmente quando as doses subseqüentes são administrados em intervalos mais freqüentes, por exemplo, uma vez a cada duas semanas até uma vez a cada mês, ou se situam na faixa de dosagem mais elevada (ou seja, de cerca 25 de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg), particularmente quando as 30

doses subseqüentes são administradas em intervalos menos freqüentes, por exemplo, quando as doses subseqüentes são administradas com intervalo de cerca de um mês a cerca de 12 meses.

5 Os anticorpos anti-CD40 presentes nas composições farmacêuticas aqui descritas para uso nos métodos da invenção podem ser nativos ou obtidos por técnicas recombinantes, e podem ser de qualquer fonte, incluindo fontes mamíferas, tais como, por exemplo, camundongo, rato, 10 coelho, primata, porco e humana. Preferivelmente, tais polipeptídeos são derivados de uma fonte humana e, mais preferivelmente, são recombinantes, proteínas humanas de linhas de células de hibridoma.

As composições farmacêuticas úteis nos métodos da 15 invenção podem compreender variantes biologicamente ativas dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção, como descrito em outra parte nessa.

Qualquer composição farmacêutica que compreenda um anticorpo anti-CD40 possuindo as propriedades de ligação 20 aqui descritas como o componente terapeuticamente ativo pode ser usada nos métodos da invenção. Desse modo, composições líquidas, liofilizadas ou secas por vaporização que compreendem um ou mais dos anticorpos anti-CD40 da invenção podem ser preparadas como uma solução ou suspensão 25 aquosa ou não aquosa para administração subseqüente a um indivíduo de acordo com os métodos da invenção. Cada uma dessas composições compreenderá pelo menos um dos anticorpos anti-CD40 como um componente terapêutica ou profilaticamente ativo. Por "componente terapêutica ou 30 profilaticamente ativo" significa que o anticorpo anti-CD40

é especificamente incorporado na composição para produzir uma resposta terapêutica ou profilática desejada com relação ao tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou condição em um indivíduo quando a composição farmacêutica é administrada àquele indivíduo. Preferivelmente, as composições farmacêuticas compreendem agentes estabilizantes apropriados, agentes de volume, ou ambos, para minimizar problemas associados à perda de estabilidade da proteína e da atividade biológica durante a preparação e estocagem.

Podem ser adicionados formulantes às composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo anti-CD40 da invenção. Esses formulantes podem incluir, sem limitação, óleos, polímeros, vitaminas, carboidratos, aminoácidos, sais, tampões, albumina, tensoativos ou agentes de volume. Preferivelmente, carboidratos incluem açúcar ou álcoois de açúcar, tais como mono-, di- ou polissacarídeos ou glicanos hidrossolúveis. Os sacarídeos ou glicanos podem incluir frutose, glicose, manose, sorbose, xilose, maltose, sacarose, dextrana, pululana, dextrina, α, β e γ ciclodextrina, amido solúvel, amido de hidroxietila e carboximetilcelulose, ou misturas destes. "Álcool de açúcar" é definido como um hidrocarboneto C₄ a C₅ com um grupo hidroxila, e inclui galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol e arabinol. Esses açúcares ou álcoois de açúcar podem ser usados individualmente ou em combinação. A concentração de açúcar ou álcool de açúcar é entre 1,0% e 7% p/v, mais preferivelmente entre 2,0% e 6,0% p/v. Preferivelmente, aminoácidos incluem formas levógiras (L) de carnitina, arginina e betaina; no entanto, podem

ser adicionados outros aminoácidos. Polímeros preferidos incluem polivinilpirrolidona (PVP) com um peso molecular médio entre 2.000 e 3.000, ou polietileno glicol (PEG) com um peso molecular médio entre 3.000 e 5.000. Tensoativos 5 que podem ser adicionados à formulação são mostrados nas EP N^{os} 270.799 e 268.110.

Adicionalmente, os anticorpos podem ser modificados quimicamente por conjugação covalente a um polímero para aumentar sua meia-vida na circulação, por exemplo. 10 Polímeros preferidos e métodos para anexá-los aos peptídeos são mostrados nas Patentes U.S. N^{os} 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; e 4.609.546; as quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades. Polímeros preferidos são polióis polioxietilados e polietileno glicol (PEG). PEG é 15 solúvel em água em temperatura ambiente e tem a fórmula geral: R(O---CH₂--CH₂)_nO-R, em que R pode ser hidrogênio, ou um grupo de proteção como, por exemplo, um grupo alquil ou alanol. Preferivelmente, o grupo de proteção tem entre 1 e 8 carbonos, mais preferivelmente é metil. O símbolo n é um 20 número inteiro positivo, preferivelmente entre 1 e 1.000, mais preferivelmente entre 2 e 500. O PEG tem um peso molecular médio preferido entre 1.000 e 40.000, mais preferivelmente entre 2.000 e 20.000, principalmente entre 3.000 e 12.000. Preferivelmente, PEG tem pelo menos um 25 grupo hidroxi, mais preferivelmente é um grupo hidroxi terminal. É esse grupo hidroxi que é preferivelmente ativado para reagir com um grupo amino livre no inibidor. No entanto, será compreendido que o tipo e a quantidade dos grupos reativos podem ser variados para se obter um 30 PEG/anticorpo da presente invenção conjugado de forma

covalente.

Polióis polioxietilados hidrossolúveis também são úteis na presente invenção. Eles incluem sorbitol polioxietilado, glicose polioxietilada, glicerol 5 polioxietilado (POG), e semelhantes. POG é preferido. Uma razão é porque a estrutura central do glicerol do glicerol polioxietilado é a mesma estrutura central de ocorrência natural, por exemplo, em animais e humanos em mono-, di-, triglicerídeos. Portanto, essa ramificação não seria 10 necessariamente vista como um agente estranho no corpo. O POG tem um peso molecular preferido na mesma faixa que o de PEG. A estrutura para POG é mostrada em Knauf e cols. (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15.064-15.070, e uma discussão de conjugados de POG/IL-2 é encontrada na Patente U.S. N° 15 4.766.106, ambos aqui incorporados por referência em suas totalidades.

Outro sistema de liberação de medicamentos para aumento da meia-vida circulatória é o lipossomo. Métodos para a preparação de sistemas de liberação de lipossomo são 20 discutidos em Gabizon e cols. (1982) *Cancer Research* 42:4.734; Cafiso (1981) *Biochem. Biophys. Acta* 649:129; e Szoka (1980) *Ann. Rev. Biophys. Eng.* 9:467. Outros sistemas de liberação de medicamentos são conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em Poznansky e cols. (1980) 25 *Drug Delivery Systems* (R.L. Juliano, ed., Oxford, Nova York), pp. 253-315; Poznansky (1984) *Pharm. Revs.* 36:277.

Os formulantes a serem incorporados em uma composição farmacêutica devem fornecer a estabilidade do anticorpo anti-CD40. Ou seja, o anticorpo anti-CD40 deve reter sua 30 estabilidade física e/ou química e ter a atividade

biológica desejada, ou seja, uma ou mais das atividades antagonistas aqui definidas anteriormente, incluindo, sem limitação, inibição da secreção de imunoglobulina por células B periféricas humanas normais estimulada por 5 células T; inibição da sobrevida e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimulada por células T de Jurkat; inibição da sobrevida e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimulada por células que expressam CD40L ou ligante CD40 10 solúvel solúvel (sCD40L); inibição de sinais intracelulares antiapoptóticos de "sobrevida" em qualquer célula estimulada por sCD40L ou CD40L de fase sólida; inibição da transmissão do sinal de CD40 em qualquer célula mediante ligação com sCD40L ou CD40L de fase sólida; e inibição da 15 proliferação de células B humanas malignas, como observado em outra seção desta especificação.

Métodos para o monitoramento da estabilidade da proteína são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. 20 (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., Nova York, Nova York); e os ensaios de estabilidade aqui revelados abaixo. Geralmente, a estabilidade da proteína é medida em uma temperatura escolhida por um período de tempo especificado. Em modalidades preferidas, 25 uma formulação farmacêutica de anticorpo estável fornece estabilidade do anticorpo anti-CD40 quando estocada em temperatura ambiente (cerca de 25°C) por pelo menos 1 mês, pelo menos 3 meses ou, pelo menos, 6 meses, e/ou é estável em cerca de 2-8°C por pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 30

24 meses.

Uma proteína como um anticorpo, quando formulada em uma composição farmacêutica, é considerada como retendo sua estabilidade física em certo momento caso ela não mostre 5 sinais visuais (ou seja, descoloração ou perda de transparência) ou sinais mensuráveis (por exemplo, com o uso de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) ou dispersão da luz UV) de precipitação, agregação e/ou desnaturação naquela composição farmacêutica. Com relação à 10 estabilidade química, uma proteína como um anticorpo, quando formulada em uma composição farmacêutica, é considerada como retendo sua estabilidade química em certo momento se as medidas da estabilidade química forem indicativas de que a proteína (ou seja, o anticorpo) retém 15 a atividade biológica de interesse naquela composição farmacêutica. Métodos para o monitoramento das alterações na estabilidade química são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, métodos para detectar quimicamente formas alteradas da proteína resultantes de picotes, 20 usando, por exemplo, SDS-PAGE, SEC e/ou ionização por dessorção da matriz assistida por laser/ espectrometria de massa por tempo de vôo; e degradação associada às alterações na carga molecular (por exemplo, associada à desamidação), usando, por exemplo, cromatografia por troca 25 iônica. Veja, por exemplo, os métodos aqui revelados abaixo.

Um anticorpo anti-CD40 quando formulado em uma composição farmacêutica, é considerado como retendo uma atividade biológica desejada em certo momento se a 30 atividade biológica desejada naquele momento for de cerca

de 30%, preferivelmente for de cerca de 20% da atividade biológica desejada exibida no momento em que a composição farmacêutica foi preparada, como determinado em uma análise adequada para a atividade biológica desejada. Análises para 5 a medida da atividade biológica desejada dos anticorpos anti-CD40 aqui revelados podem ser realizadas como descrito nos Exemplos aqui apresentados. Veja também os ensaios descritos em Schultze e cols. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8.200-8.204; Denton e cols. (1998) *Pediatr. 10 Transplant.* 2:6-15; Evans e cols. (2000). *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman e cols. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan e cols. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom e cols. (1993) *Immunology* 79:439-444; e 15 nas Patentes U.S. N°s 5.674.492 e 5.847.082, aqui incorporadas por referência.

Em algumas modalidades da invenção o anticorpo anti-CD40 é formulado como uma formulação farmacêutica líquida, a composição farmacêutica líquida. O anticorpo anti-CD40 20 pode ser preparado com o uso de qualquer método conhecido na técnica, incluindo aqueles métodos revelados acima. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD40 é produzido de forma recombinante em uma linha de células CHO.

Quando o anticorpo anti-CD40 é estocado antes de sua 25 formulação, ele pode ser congelado, por exemplo, a ≤ 20°C, e então descongelado em temperatura ambiente para posterior formulação. A formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40. A quantidade de anticorpo presente na formulação leva 30 em consideração a via de administração e o volume de dose

desejado.

Dessa forma, a composição farmacêutica líquida compreendo anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml a 5 cerca de 40,0 mg/ml, cerca de 1,0 mg/ml a cerca de 30,0 mg/ml, cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 20,0 mg/ml, ou cerca de 15,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica líquida compreendo anticorpo anti-CD40 em uma 10 concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 5,0 mg/ml, cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 10,0 mg/ml, cerca de 10,0 mg/ml a cerca de 15,0 mg/ml, cerca de 15,0 mg/ml a cerca de 20,0 mg/ml, cerca de 20,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, cerca de 25,0 mg/ml a cerca de 30,0 mg/ml, cerca de 30,0 mg/ml a cerca de 35,0 mg/ml, cerca de 35,0 mg/ml a cerca de 40,0 mg/ml, cerca de 40,0 mg/ml a cerca de 45,0 mg/ml, ou 15 cerca de 45,0 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml. Em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreendo anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 15,0 mg/ml, cerca de 16,0 mg/ml, cerca de 17,0 mg/ml, cerca de 18,0 mg/ml, cerca de 19,0 mg/ml, cerca de 20,0 mg/ml, cerca 20 de 21,0 mg/ml, cerca de 22,0 mg/ml, cerca de 23,0 mg/ml, cerca de 24,0 mg/ml, ou cerca de 25,0 mg/ml. A composição farmacêutica líquida compreendo anticorpo anti-CD40 e um 25 tampão que mantém o pH da formulação na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, incluindo cerca de pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, e outros valores na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0. Em algumas 30 modalidades, o tampão mantém o pH da formulação na faixa de

cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, cerca de pH 5,5 a cerca de 7,0, cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0.

5 Qualquer tampão adequado que mantenha o pH da formulação líquida de anticorpo anti-CD40 na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0 pode ser usado na formulação, desde que a estabilidade físico-química e atividade biológica desejada do anticorpo sejam retidas como apontado
10 acima. Tampões adequados incluem, sem limitação, ácidos convencionais e sais desses, em que o contra-íon pode ser, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio, ou magnésio. Exemplos de ácidos convencionais e sais desses que podem ser usados para tamponar a formulação farmacêutica líquida
15 incluem, sem limitação, tampões de ácido succínico ou succinato, ácido cítrico ou citrato, ácido acético ou acetato, ácido tartárico ou tartarato, ácido fosfórico ou fosfato, ácido glucônico ou gluconato, ácido glutâmico ou glutamato, ácido aspártico ou aspartato, ácido maleico ou maleato, e ácido málico ou malato. A concentração do tampão na formulação pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, incluindo cerca de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, ou outros valores na faixa de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em
20 algumas modalidades, a concentração do tampão na formulação é de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, incluindo cerca de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, ou outros valores na faixa de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM.
25

30 Em algumas modalidades da invenção, a formulação

farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 e tampão de succinato ou tampão de citrato em uma concentração que mantém o pH da formulação na faixa de cerca de pH 5,0 a 5 cerca de pH 7,0, preferivelmente cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5. por "tampão de succinato" ou "tampão de citrato" entende-se um tampão que compreende um sal de ácido succínico ou um sal de ácido cítrico, respectivamente. Em uma modalidade preferida, o contra-ión de succinato ou 10 citrato é o cátion sódio, e assim o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio, respectivamente. No entanto, qualquer cátion deve ser eficaz. Outros cátions de succinato ou citrato possíveis incluem, sem limitação, potássio, amônio, cálcio, e magnésio. Como acima observado, 15 a concentração do tampão de succinato ou citrato na formulação pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, incluindo cerca de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, ou outros valores na faixa de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em 20 algumas modalidades, a concentração de tampão na formulação é de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, incluindo cerca de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, ou cerca de 15 mM. Em outras modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreendo anticorpo anti-CD40 em uma 25 concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml, ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, e tampão de succinato ou citrato, por exemplo, tampão de succinato de sódio ou citrato de sódio, em uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, 30 preferivelmente cerca de 10 mM.

Quando é desejável para a formulação farmacêutica líquida que seja próxima de isotônica, a formulação farmacêutica líquida que compreendo anticorpo anti-CD40 e um tampão pode compreender também uma quantidade de uma agente de isotonicidade suficiente para tornar a formulação próxima de isotônica. Por "próxima de isotônica" entende-se que a formulação aquosa tem uma osmolaridade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360 mmol/kg, preferivelmente cerca de 240 a cerca de 340 mmol/kg, mais preferivelmente cerca de 250 a cerca de 330 mmol/kg, ainda mais preferivelmente cerca de 260 a cerca de 320 mmol/kg, still mais preferivelmente cerca de 270 a cerca de 310 mmol/kg. Métodos de determinação da isotonicidade de uma solução são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Veja, por exemplo, Setnikar e cols. (1959) J Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Aqueles habilitados na técnica estão familiarizados com vários solutos farmaceuticamente aceitáveis úteis em fornecer isotonicidade em composição farmacêuticas. O agente de isotonicidade pode ser qualquer reagente capaz de ajustar a pressão osmótica de uma formulação farmacêutica líquida da presente invenção a um valor quase igual àquele de um fluido corporal. É desejável usar um agente de isotonicidade fisiologicamente aceitável. Portanto, a formulação farmacêutica líquida que compreende a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 e um tampão também pode compreender componentes que podem ser usados para fornecer isotonicidade, por exemplo, cloreto de sódio; aminoácidos como alanina, valina, e glicina; açúcares e álcoois de açúcares (polióis), incluindo, sem limitação,

glicose, dextrose, frutose, sacarose, maltose, manitol, trehalose, glicerol, sorbitol, e xilitol; ácido acético, outros ácidos orgânicos ou seus sais, e quantidades relativamente menores de citratos ou fosfatos. A pessoa de 5 habilidade comum é ciente de agentes adicionais que são adequados para fornecer tonicidade ótima da formulação líquida.

Em algumas modalidades preferidas, a formulação farmacêutica líquida que compreende um anticorpo anti-CD40 10 e um tampão também compreende cloreto de sódio como o agente de isotonicidade. A concentração de cloreto de sódio na formulação dependerá da contribuição de outros componentes para a tonicidade. Em algumas modalidades, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 50 mM a 15 cerca de 300 mM, cerca de 50 mM a cerca de 250 mM, cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, cerca de 50 mM a cerca de 175 mM, cerca de 50 mM a cerca de 150 mM, cerca de 75 mM a cerca de 175 mM, cerca de 75 mM a cerca de 150 mM, cerca de 100 mM a cerca de 175 mM, cerca de 100 mM a cerca de 200 mM, cerca 20 de 100 mM a cerca de 150 mM, cerca de 125 mM a cerca de 175 mM, cerca de 125 mM a cerca de 150 mM, cerca de 130 mM a cerca de 170 mM, cerca de 130 mM a cerca de 160 mM, cerca de 135 mM a cerca de 155 mM, cerca de 140 mM a cerca de 155 mM, ou cerca de 145 mM a cerca de 155 mM. Em uma tal 25 modalidade, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM. Em outra modalidades, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM, o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio em uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, a formulação farmacêutica líquida 30 compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do

anticorpo anti-CD40 e a formulação tem um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5. Em outras modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreende o 5 anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, cerca de 150 mM de cloreto de sódio, e cerca de 10 mM de succinato de sódio ou citrato de sódio, em um pH de cerca de pH 5,5.

10 A degradação de proteína devida a congelamento/descongelamento ou corte mecânico durante o processo da formulação farmacêutica líquidas da presente invenção pode ser inibida por incorporação de tensoativos na formulação para diminuir a tensão de superfície em uma 15 interface solução-ar. Portanto, em algumas modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40, um tampão, e também compreende um tensoativo. Em outras modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreende um anticorpo 20 anti-CD40, um tampão, um agente de isotonicidade, e também compreende um tensoativo.

Tensoativos típicos empregados são tensoativos não iônicos, incluindo ésteres de polioxietileno sorbitol como polissorbato 80 (Tween 80) e polissorbato 20 (Tween 20); 25 ésteres de polioxipropileno-polioxietileno como Pluronic F68; álcoois de polioxietileno como Brij 35; simeticona; polietileno glicol such as PEG400; lisofosfatidilcolina; e polioxietileno-p-t-octilfenol como Triton X-100. A estabilização clássica de fármacos por tensoativos ou 30 emulsificantes é descrita, por exemplo, em Levine e cols.

(1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45(3):160-165, aqui incorporado por referência. Um tensoativo preferido empregado na prática da presente invenção é polissorbato 80. Quando um tensoativo é incluído, ele é tipicamente adicionado em uma quantidade de cerca de 0,001 % a cerca de 1,0% (w/v), cerca de 0,001% a cerca de 0,5%, cerca de 0,001% a cerca de 0,4%, cerca de 0,001% a cerca de 0,3%, cerca de 0,001% a cerca de 0,2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5%, cerca de 0,005% a cerca de 0,2%, cerca de 0,01% a 10 cerca de 0,5%, cerca de 0,01% a cerca de 0,2%, cerca de 0,03% a cerca de 0,5%, cerca de 0,03% a cerca de 0,3%, cerca de 0,05% a cerca de 0,5%, ou cerca de 0,05% a cerca de 0,2%.

Portanto, em algumas modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40, o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio em uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, cerca de 5 mM a cerca de 25 mM, ou cerca de 5 mM a cerca de 15 mM; a formulação tem 20 um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5; e a formulação também compreende um tensoativo, por exemplo, polissorbato 80, em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% ou cerca de 0,001% to cerca de 0,5%. Tais 25 formulações podem compreender opcionalmente um agente de isotonicidade, como cloreto de sódio em uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, ou cerca de 50 mM a cerca de 150 mM. Em outras modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreendo 30 anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 0,1

mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, incluindo cerca de 20,0 mg/ml; cerca de 50 mM a cerca de 200 mM de cloreto de sódio, incluindo cerca de 150 mM de cloreto de sódio; succinato de sódio ou 5 citrato de sódio a cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, incluindo cerca de 10 mM de succinato de sódio ou citrato de sódio; cloreto de sódio em uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, incluindo cerca de 150 mM; e opcionalmente um tensoativo, por exemplo, polissorbato 80, 10 em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0%, incluindo cerca de 0,001% a cerca de 0,5%; em que a formulação farmacêutica líquida tem um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, cerca de pH 5,5 to cerca 15 de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0.

A formulação farmacêutica líquida pode ser essencialmente livre de quaisquer conservantes e outros veículos, excipientes, ou estabilizantes apontados acima. Alternativamente, a formulação pode incluir um ou mais 20 conservantes, por exemplo, agentes antibacterianos, veículos farmaceuticamente aceitáveis, excipientes, ou estabilizantes acima descritos desde que eles não afetam de forma adversa a estabilidade físico-química do anticorpo anti-CD40. Exemplos de veículos aceitáveis, excipientes, e 25 estabilizantes incluem, sem limitação, agentes de tamponamento adicionais, co-solventes, tensoativos, antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina, agentes quelantes como EDTA, complexos de metal (por exemplo, complexos Zn-proteína), e polímeros biodegradáveis 30 como poliésteres. Uma discussão da formulação e seleção de

veículos farmaceuticamente aceitáveis, estabilizantes, e isomolitos pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), aqui incorporada by reference.

5 "Veículos", como aqui usados, incluem veículos, excipientes ou estabilizadores farmaceuticamente aceitáveis, que são atóxicos para a célula ou mamífero que está sendo exposto a ele nas dosagens e concentrações empregadas. Freqüentemente, o veículo fisiologicamente 10 aceitável é uma solução aquosa com pH tamponado. Exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipeptídeos com baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos de 15 aminoácidos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, 20 incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como, por exemplo, EDTA; álcoois de açúcar, tais como manitol ou sorbitol; contra-íons formadores de sal como, por exemplo, sódio; e/ou tensoativos não iônicos como, por exemplo, TWEEN, polietileno glicol (PEG) e Plurônicos.

25 A administração "em combinação com" um ou mais agentes terapêuticos adicionais inclui a administração simultânea (concomitante) e consecutiva em qualquer ordem.

Depois de a formulação farmacêutica líquida ou outra composição farmacêutica aqui descrita ser preparada, ela 30 pode ser liofilizada para evitar degradação. Métodos para a

liofilização de composições líquidas são conhecidos para aqueles habilitados na técnica. Imediatamente antes de ser utilizada, a composição pode ser reconstituída com um diluente estéril (solução de Ringer, água destilada ou soro fisiológico estéril, por exemplo) que pode incluir ingredientes adicionais. Com a reconstituição, a composição é administrada preferivelmente aos indivíduos com o uso daqueles métodos que são conhecidos por aqueles habilitados na técnica.

Em algumas modalidades, o anticorpos anti-CD40 pode ser administrado em combinação com pelo menos uma outra terapia conhecida para doenças inflamatórias e/ou autoimunes. Tais terapias incluem, sem limitação, cirurgia ou procedimentos cirúrgicos (por exemplo, esplenectomia, linfadenectomia, tireoidectomia, plasmaferese, leucoferese, transplante de células, tecidos ou órgãos, procedimentos intestinais, perfusão de órgãos, e semelhantes), radioterapia, terapias como terapia com esteróide e terapia não esteroidal, terapia hormonal, terapia com citocina, terapia com agentes dermatológicos (por exemplo, agentes tópicos usados para tratar condições cutâneas, tais como alergias, dermatite de contato e psoríase), terapia imunossupressora, e outra terapia antiinflamatória com anticorpo monoclonal, e semelhantes. Quando os métodos da presente invenção compreende regimes terapêuticos combinados, essas terapias poderão ser dadas simultaneamente, ou seja, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação de antígeno deste é administrado concomitantemente ou dentro do mesmo intervalo de tempo que a outra terapia (ou seja, as terapias acontecem

concomitantemente, mas o anticorpo anti-CD40, ou fragmento de ligação de antígeno deste, não é administrado precisamente ao mesmo tempo que a outra terapia). Alternativamente, o anticorpo antagonista anti-CD40 da 5 presente invenção, ou fragmento de ligação de antígeno deste, também pode ser administrado antes ou subseqüentemente à outra terapia. A administração seqüencial das diferentes terapias anticancerígenas pode ser realizada independentemente do fato de o indivíduo 10 tratado responder à primeira série de terapia para diminuir a possibilidade de remissão ou recidiva.

Dessa maneira, os anticorpos anti-CD40 são administrados em combinação com pelo menos uma outra terapia, incluindo, sem limitação, cirurgia, fusão de 15 órgãos, terapia de radiação, terapia com esteróide e terapia não esteroidal, terapia antibiótica, terapia antifúngica, terapia hormonal, terapia com citocina, terapia com agentes dermatológicos (por exemplo, agentes tópicos usados para tratar condições cutâneas, tais como 20 alergias, dermatite de contato e psoríase), terapia imunossupressora, outra terapia antiinflamatória com anticorpo monoclonal, combinações destas, e semelhantes. Assim, quando as terapias combinadas compreendem a 25 administração de um anticorpo anti-CD40 em combinação com a administração de um outro agente terapêutico, como com esteróides como um exemplo, os métodos da invenção englobam a coadministração, usando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva em qualquer ordem.

30 Exemplos de medicamentos imunossupressores, que podem

ser administrados em combinação com anticorpos anti-CD40 incluem, sem limitação, metotrexate, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tais como, por exemplo, ciclosporina em aerossol (veja, Publicação de 5 Pedido de Patente U.S. N° US20020006901, aqui incorporada em sua totalidade por referência), tacrolimus (FK506; ProGraf™), micofenolato mofetil e azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxispergualina, leflunomida e seus análogos de malononitriloamida; e 10 proteínas imunossupressoras, incluindo,

Exemplos de agentes antiinflamatórios adequados que podem ser administrados em combinação com anticorpos anti-CD40 incluem, sem limitação, corticosteróides como, por exemplo, clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, 15 triamcinolona, betametasona, fluocinola, fluocinonida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona; medicamentos antiinflamatórias não esteróides (NSAIDs) como, por exemplo, sulfasalazina, medicações contendo mesalamina (conhecidas como agentes 5-ASA), celecoxib, diclofenaco, 20 etodolac, fenprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, meclofamato, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salicilatos, sulindac, e tolmetina; Embrel®, (um receptor de TNF solúvel), anticorpos antiinflamatórios como adalimumab (HUMIRA®, um 25 antagonista de TNF- α) e infliximab (Remicade®, um antagonista de TNF- α), e outros.

A rejeição de transplantes e a doença enxerto versus hospedeiro pode ser hiperaguda (humoral), aguda (mediada por células T) ou crônica (etiologia desconhecida), ou uma 30 combinação destas. Desse modo, os anticorpos anti-CD40 da

invenção são usados em algumas modalidades para evitar e/ou melhorar a rejeição e/ou sintomas associados à rejeição de transplantes hiperaguda, aguda e/ou crônica de qualquer tecido, incluindo, sem limitação, fígado, rim, pâncreas, 5 células da ilhota pancreática, intestino delgado, pulmão, coração, córneas, pele, vasos sanguíneos, osso, medula óssea heteróloga ou autóloga, e semelhantes. Tecidos de enxerto podem ser obtidos de qualquer doador e transplantados em qualquer hospedeiro receptor e, desse modo, o procedimento de transplante pode compreender o 10 transplante de tecido animal para humanos (por exemplo, xenoenxertos), o transplante de tecido de um humano para outro humano (por exemplo, aloenxertos) e/ou o transplante de tecido de uma parte do corpo de um humano para outra 15 (por exemplo, autoenxertos). O tratamento com os anticorpos da invenção também podem reduzir as seqüelas do transplante, tais como febre, anorexia, anormalidades hemodinâmicas, leucopenia, infiltração leucocitária do órgão/tecido transplantado, além de infecções oportunistas.

20 Em modalidades em que os anticorpos anti-CD40 da invenção são usados para tratar rejeição a enxerto, artrite reumatóide, ou esclerose múltipla, os anticorpos podem ser usados em combinação com medicamentos imunossupressores adequados como aqui descrito.

25 Portanto, a invenção fornece o uso de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 em um 30 paciente humano heterozigótico ou homozigótico para

FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), em que o medicamento é coordenado com tratamento com pelo menos uma outra terapia.

Por "coordenado", entende-se que o medicamento que compreende anticorpo anti-CD40 deve ser usado antes, 5 durante ou após o tratamento do indivíduo com pelo menos uma outra terapia.

A invenção também fornece o uso de um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença 10 autoimune que está associada a células que expressam CD40, em que o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F) e foi pré-tratado com pelo menos um outro agente terapêutico.

Por "pré-tratado" ou "pré-tratamento" significa que o 15 indivíduo recebeu uma ou mais outras terapias (ou seja, foi tratado com pelo menos uma outra terapia), antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo anti-CD40. "Pré- tratado" ou "pré-tratamento" inclui indivíduos que foram tratados com pelo menos uma outra terapia em um intervalo 20 de 2 anos, em um intervalo de 18 meses, em um intervalo de 1 ano, em um intervalo de 6 meses, em um intervalo de 2 meses, em um intervalo de 6 semanas, em um intervalo de 1 mês, em um intervalo de 4 semanas, em um intervalo de 3 semanas, em um intervalo de 2 semanas, em um intervalo de 1 25 semana, em um intervalo de 6 dias, em um intervalo de 5 dias, em um intervalo de 4 dias, em um intervalo de 3 dias, em um intervalo de 2 dias, ou até mesmo em um intervalo de 1 dia, antes do início do tratamento com o medicamento que compreende o anticorpo anti-CD40. Não é necessário que o 30 indivíduo tenha respondido ao pré-tratamento com a terapia

anterior, ou com as terapias anteriores. Desse modo, o indivíduo que recebe o medicamento que compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 poderia ter respondido ou não (ou seja, a doença foi refratária), ao pré-tratamento 5 com a terapia anterior, ou a uma ou mais das terapias anteriores, em que o pré-tratamento compreendeu múltiplas terapias. Exemplos de outras terapias para as quais um indivíduo pode ter recebido pré-tratamento antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo anti-CD40 incluem, 10 sem limitação, as terapias para doenças inflamatórias ou doenças autoimunes descritas em outra parte nessa.

"Tratamento", no contexto do uso coordenado de um medicamento aqui descrito com uma ou mais outras terapias, é aqui definido como a aplicação ou administração do 15 medicamento ou da outra terapia a um indivíduo, ou a aplicação ou administração do medicamento ou outra terapia a um tecido isolado ou linha de células de um indivíduo, em que o indivíduo tem doença inflamatória ou doença autoimune 20 associada com células que expressam CD40, um sintoma associado com tal doença, ou uma predisposição para o desenvolvimento de tal doença, em que o objetivo é o de curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, ou afetar a doença, qualquer sintoma associado da doença, ou a predisposição em relação ao desenvolvimento da doença.

25 Em algumas modalidades, a terapia de combinação fornece uma melhoria sinérgica na eficácia terapêutica em relação aos agentes terapêuticos individuais quando administrados isoladamente. O termo "sinergia" é usado para descrever um efeito combinado de dois ou mais agentes 30 ativos que é maior que a soma dos efeitos individuais de

cada agente ativo respectivo. Portanto, quando o efeito combinado de dois ou mais agentes resulta em "inibição sinérgica" de uma atividade ou processo, entende-se que a inibição da atividade ou processo é maior que a soma dos 5 efeitos inibidores de cada agente ativo respectivo. O termo "efeito terapêutico sinérgico" refere-se a um efeito terapêutico observado com uma combinação de duas ou mais terapias em que o efeito terapêutico (como medido por qualquer um de inúmeros parâmetros) é maior que a soma dos 10 efeitos terapêuticos individuais observados com as terapias individuais respectivas.

Vários aspectos e modalidades da presente invenção serão agora descritos em maiores detalhes por via exemplo apenas. Deve-se perceber que modificação de detalhe pode 15 ser feita sem fugir do escopo da invenção.

EXPERIMENTAL

O anticorpo anti-CD40 usado nos exemplos abaixo é CHIR-12.12. A produção, seqüenciamento e caracterização do anticorpo CHIR-12.12 é descrita em detalhes nos pedidos de 20 patente internacionais publicados como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294. A linha de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) que expressa o 25 anticorpo CHIR-12.12 foi depositada com a "American Type Culture Collection "[ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] sob o número de Depósito de Patente PTA-5543.

Os exemplos a seguir são baseados na ligação de CHIR-12.12 a linhas de células cancerosas e células de pacientes 30 com câncer. No entanto, todos os exemplos a seguir são

diretamente relevantes ao uso de CHIR-12.12 para tratar doenças inflamatórias and/ou doenças autoimunes, porque eles ilustram características do anticorpo CHIR-12.12 que são igualmente relevantes para o tratamento de doenças inflamatórias e/ou doenças autoimunes que usa anticorpos anti-CD40.

Exemplo 1: Análise de ADCC em linhas de células

CHIR-12.12 e rituximab foram comparados para sua atividade de ADCC relativa contra várias linhas de células b malignas que expressam抗ígenos CD40 e CD20, incluindo linhas de células de linfoma (Daudi, Namalwa), linhas de células de mieloma múltiplo (ARH77, IM-9), uma linha de células B-ALL (CCRF-SB), e uma linha de células B-CLL (EHEB).

A eficácia de ADCC e potência medidas como lise percentual máxima e ED₅₀, respectivamente, foram comparadas para CHIR-12.12 e rituximab. Os resultados desses experimentos são mostrados nas Figuras 1A-1F. Para todas as linhas de células alvo, CHIR-12.12 foi um mediador mais potente e eficaz de ADCC que rituximab. Nas seis linhas de células testadas, o número de moléculas CD20 de superfície celular por célula era de 2,6 a 30,8 vezes maior que de CD40. Esses dados mostram que a despeito de apresentar menos moléculas de CD40 que CD20, linhas de células B malignas são mais eficazmente lisadas por CHIR-12.12 que rituximab.

Exemplo 2: Análise de ADCC em células de pacientes com CLL

A atividade de ADCC relativa de CHIR-12.12 e rituximab contra células de CLL primária ex vivo de 8 pacientes foi comparada. CHIR-12.12 exibiu maior ADCC que rituximab

contra CLL de todos os pacientes (veja, Figura 2A-D e Figura 3). Os resultados são resumidos na Figura 3. CHIR-12.12 é mais potente que rituximab.

Desenho de experimento de citotoxicidade celular dependente

5 *de anticorpo (ADCC)*

Células alvo: células de paciente com CLL, 5.000/cavidade. Células efetoras: células NK humanas normais purificadas, 50.000/cavidade. Proporção E:T: 10. concentração de Abs: 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1 e 10 10 µg/ml. Tempo de incubação: 4 horas. Meio de cultura: RPMI (w/o fenol vermelho) + 10% FBS + 1% P/S. Dispositivo de cultura: placa de fundo redondo de 96 cavidades. leitura: liberação de Calceína AM medida por "Arbitrary Fluorescent Units" (AFU) com 485 nm excitação/535 nm 15 emissão. Cálculo: % de lise específica = 100 x (AFU teste – AFU de liberação espontânea 1) / (AFU de liberação máxima 2 – AFU espontânea). Controle negativo: Calceína liberada por células alvo na ausência de anticorpo ou célula NK. Controle positivo: Calceína liberada por células alvo com 20 lise por detergente (1% NP40).

Os resultados ilustrados nas Figuras 2 e 3 mostram que CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de paciente com CLL. A magnitude da diferença de ADCC pode depender das células alvo ou das células doadoras NK mas 25 foi observada contra todas as amostras de paciente. quando células de CLL de paciente único foram testadas com dois diferentes doadores de NK, CHIR-12.12 mediou maior ADCC que rituximab for para ambas células NK doadoras, embora a magnitude da ADCC diferencial não tenha sido idêntica 30 (veja, Figura 4). A base mecânica para essa ADCC superior

deve incluir os níveis de expressão relativos dos抗ígenos alvo (CD20 e CD40), a extensão da internalização do anticorpo, e a afinidade do anticorpo para o receptor de Fc γ IIIa em células NK. Portanto, a influência desses 5 fatores na atividade de ADCC de CHIR12.12 e rituximab foi investigada.

Exemplo 3: Quantificação de moléculas de CD40 e CD20 de superfície celular

A densidade quantitativa de CD20 e CD40 em células de CLL (Exemplo 3) e o grau de internalização de anticorpo (Exemplo 4) foram investigados como razões potenciais para a diferença acima descrita na atividade de ADCC. A maior atividade de ADCC e eficácia de CHIR-12.12 não foi dependente de uma maior densidade de moléculas de CD40 de 15 superfície celular, uma vez que foram números 1,3 a 14 vezes maiores de moléculas CD20 que CD40 na superfície celular (veja, Figura 5 e Figura 6).

Métodos

As células foram pré-incubadas com IgG1 humana a 1 20 mg/ml em tampão de coloração (PBS contém 1% BSA, 0,1% Na Azida) para bloquear sítios de ligação não específicos. Elas foram incubadas por 30 minutos a 4°C (em gelo). Então controle de isotipo de IgG1 humana conjugada a FITC, CHIR- 25 12.12 conjugado a FITC, ou rituximab conjugado a FITC foram adicionados a 100, 10, 1, 0,1 µg/ml, e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C (em gelo). As células foram lavadas com tampão de coloração (PBS+1%FBS+0,1% Azida de sódio), e analisadas por FACS Calibur.

A média geométrica de intensidade de fluorescência foi 30 medida por FACS. Moléculas de "Equivalent Soluble

"Fluorochrome" (MESF) foram então calculadas com base na curva padrão estabelecida por glóbulos FITC calibrados.

Exemplo 4: CHIR-12.12 não induz internalização após ligação a CD40 em linhas de células

5 Daudi, uma linha de células de linfoma, e ARH77, uma linha de células de MM, foram usadas to para avaliar o efeito da ligação de CHIR-12.12 sobre a internalização. Células foram incubadas com IgG1 humana (anticorpo de controle) ou CHIR-12.12 a 1 µg/mL em gelo (com 0,1% azida de sódio para bloquear a internalização) ou 37°C (sem azida de sódio) por 3 horas. Depois de uma lavagem com tampão de coloração frio (PBS + 1% BSA + 0,1% azida de sódio), as células foram coradas com IgG-FITC anti-humana de cabra por 30 minutos em gelo. A média geométrica de intensidade 10 fluorescente (MFI) foi registradas por FACS Calibur. Nenhuma diferença na MFI foi observada entre as células 15 incubadas com CHIR-12.12 em gelo na presença de azida de sódio ou a 37°C na ausência de azida de sódio (Figura 7). Eses dados mostram que CHIR-12.12, com ligação a CD40, não 20 é internalizado e continua a ser apresentado na superfície celular.

Exemplo 5: Internalização de CHIR-12.12 e Rituximab após ligação a células de paciente com CLL : FACS e microscopia confocal

25 **Metodologia de FACS**

Células foram incubadas com huIgG1, CHIR-12.12, ou rituximab a 10 µg/ml por 3 horas a 40°C (com 0,1% azida de Na) ou 37°C (w/o azida de Na). As células foram lavadas com tampão de coloração (PBS + 1% FBS + 0,1% azida de Na), IgG- 30 FITC anti-humana de cabra foi então adicionada, e então as

células foram incubadas por 30 minutos a 40°C, e analisadas por FACS Calibur.

Metodologia de microscopia confocal

As células foram incubadas com Alexa 488 ou CHIR-12.12 conjugado a FITC, rituximab, e IgG1 a 10 µg/ml, por 3 horas a 40°C (com 0.1% azida de Na) ou 37°C (w/o azida de Na). As células foram então lavadas e fixadas com 2% formaldeído, 5 min em temperatura ambiente. As células foram então lavadas e colocadas em laminas revestidas com poli-L-lisina, montadas, e seladas e então analisadas por imagem confocal.

Resultados

Os resultados desses experimentos são ilustrados na Figura 8 (FACS) e Figuras 9 e 10 (microscopia confocal). Os resultados desses experimentos são resumidos na Figura 11. Esses estudos de internalização de anticorpo que usam células primárias de CLL conduzidos por citometria de fluxo e microscopia confocal mostram que com ligação a CD40 a 37°C, CHIR-12.12 permanece uniformemente distribuído na superfície celular, mesmo depois de 3 horas. Em contraste, depois de ligação a 37°C, rituximab é redistribuído em caps e internalizado. Esses dados sugerem que a potente atividade de ADCC de CHIR-12.12 pode ser relacionada a sua capacidade de se apresentar uniformemente na superfície de células alvo, permitindo ótima interação com células efetoras. Esses resultados sugerem que CHIR12.12 pode ser eficaz na mediação de potente ADCC contra células CLL *in vivo*.

Exemplo 6: Análise Biacore de ligação de FcγRIIIa por Rituxan® e CHIR-12.12

As afinidade de alelos aa158F e aa158V de FcγRIIIa por

CHIR-12.12 e rituximab foi comparada por análise padrão Biacore®. CHIR-12.12 ligou o alelo aa158F com uma afinidade 4,6 vezes maior quando comparado com rituximab (K_D de 2,8 μM versus 13 μM , respectivamente). Os resultados desses 5 experimentos são resumidos na tabela a seguir:

	K_D (nM)	
	<i>CHIR-12.12</i>	<i>Rituximab</i>
Fc γ RIIIa 158V	492	466
Fc γ RIIIa 158F	2800	13000

10 **Exemplo 7: O efeito de polimorfismo de Fc μ RIIIa sobre ADCC por células efetoras NK**

A citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) é um mecanismo de ação principal para vários anticorpos monoclonais comercializados e de pesquisa.

15 Rituximab (Rituxan®), comercializado para o tratamento de linfoma folicular não Hodgkin (NHL) e ativo em outras malignidades de células B, tem ADCC como um de seus mecanismos de ação primários. Notavelmente, a atividade clínica de rituximab em NHL mostrou estar correlacionada 20 com o genótipo Fc γ RIIIa. Pacientes com o polimorfismo de Fc γ RIIIa 158aa de V/V ou V/F são mais responsivos a rituximab que aqueles com F/F (por exemplo, veja, Cartron e cols. (2002) Blood 99(3):754-758 ou Dall'Ozzo e cols. (2004) Cancer Res. 64:4664-4669).

25 Nesses experimentos, células NK efetoras purificadas de doadores múltiplos humanos que expressam vários polimorfismos de Fc γ RIIIa aa158 foram avaliadas com o uso da linha de células Daudi de linfoma humano como as células alvo (veja, Figuras 12 e 13). Como ilustrado por aquelas 30 figuras, CHIR-12.12 induziu potente ADCC com células NK de

todos os três genótipos. As ED₅₀s de CHIR-12.12 para lise da linha de células Daudi foram 4, 2, e 0,4 μM para F/F, V/F e V/V, respectivamente (Figura 13). As ED₅₀s de rituximab para lise da linha de células Daudi foram 53, 21, 5 e 9 μM para F/F, V/F, e V/V, respectivamente (Figure 13).

As células NK efetoras purificadas de doadores múltiplos humanos que expressam vários polimorfismos de FcγRIIIa aa158 foram também avaliadas com o uso de células de paciente com CLL como as células alvo(veja, Figura 14). 10 CHIR-12.12 foi um mediador mais potente de ADCC que rituximab contra todas as células de paciente com CLL testadas (Figura 14). Esses dados sugerem que CHIR-12.12 é um mediador mais potente de ADCC que rituximab, mesmo com células NK do genótipo aa158 V/F ou F/F.

15 Esses achado são surpreendentes porque seria esperado que CHIR12.12 seria significativamente menos potente em ensaios de ADCC que usam células NK com o polimorfismo de FcγRIIIa 158aa de F/F ou V/F que aquelas com V/V. Novamente, a atividade clínica de rituximab em NHL mostrou 20 estar correlacionada com o genótipo de FcγRIIIa. Pacientes com o polimorfismo de FcγRIIIa 158aa de V/V ou V/F são mais responsivos a rituximab que aqueles com F/F. Rituximab é também um anticorpo monoclonal IgG1 que se liga a um antígeno expresso na superfície de células B, e assim seria 25 esperado que CHIR-12.12 apresentasse a mesma preferência para o polimorfismo FcγRIIIa-158 V. ao contrário, constatou-se que CHIR-12.12 induz potente ADCC com células NK de todos os três genótipos.

30 Muitas modificações e outras modalidades das invenções aqui apresentadas ocorrem àqueles habilitados na técnica,

aos quais essas invenções pertencem, tendo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições anteriormente apresentadas e nos desenhos associados. Portanto, deve-se entender que as invenções não se limitam às modalidades 5 específicas reveladas e que modificações e outras modalidades estão incluídas dentro do escopo das reivindicações em anexo aqui reveladas. Embora sejam aqui empregados termos específicos, eles são utilizados apenas em um sentido genérico e descritivo e não com finalidade 10 limitante.

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados nessa são aqui incorporados por referência na mesma extensão como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para 15 ser incorporado por referência.

Listagem de Sequência

<110> Aukerman, Sharon Lea
Luqman, Mohammad

<120> Usos de anticorpos anti-CD40

<130> PP028185.0002 (319124)

<150> 60/732,580
<151> 01/11/2005

<160> 9

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1
<211> 720
<212> DNA
<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Seqüência codificadora para cadeia leve de anticorpo anti-CD40
humano 12.12

<221> CDS
<222> (1)...(720)

<pre> atg gcg ctc cct got cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Ile Leu Met Leu Trp Val Ser 1 5 10 15 </pre>	48
<pre> gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr 20 25 30 </pre>	96
<pre> gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser 35 40 45 </pre>	144
<pre> ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys 50 55 60 </pre>	192
<pre> cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala 65 70 75 80 </pre>	240
<pre> tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe 85 90 95 </pre>	288
<pre> aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr 100 105 110 </pre>	336
<pre> tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys 115 120 125 </pre>	384
<pre> gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 130 135 140 </pre>	432
<pre> cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg </pre>	480

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu			
145	150	155	160
ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat			528
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp			
165	170	175	
aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac			576
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp			
180	185	190	
agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aza			624
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys			
195	200	205	
gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag			672
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			
210	215	220	
ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag			720
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *			
225	230	235	

<210> 2
<211> 239
<212> FRT
<213> Seqüência artificial

<220>
<223> Cadeia leve de anticorpo anti-Cd40 humano 12.12

<400> 2			
Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser			
1	5	10	15
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr			
20	25	30	
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser			
35	40	45	
Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys			
50	55	60	
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala			
65	70	75	80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
85	90	95	
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr			
100	105	110	
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys			
115	120	125	
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
130	135	140	
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu			
145	150	155	160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp			
165	170	175	
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp			
180	185	190	
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys			
195	200	205	
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			
210	215	220	
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
225	230	235	

<210> 3
<211> 2016

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Seqüência codificadora para cadeia pesada de anticorpo anti-CD40 humano
12.12 (com íntrons)

<400> 3

atg gag ttt	ggg ctg	agc tgg	gtt ttc	ctt gtt	gtc att	tta aga	ggt 48
gtc cag tgt	cag gtg	cag ttg	gtg gag	tct ggg	gga ggc	gtg gtc	cag 96
cct ggg agg	tcc ctg	aga ctc	tcc tgc	tgt gca	gcc tct	gga ttc	acc ttc 144
agt agc tat	ggc atg	cac tgg	gtc cgc	cag gct	cca ggc	aag ggg	ctg 192
gag tgg gtg	gca gtt	ata tca	tat gag	gaa agt	aat aga	tac cat	gca 240
gac tcc gtg	aag ggc	cga ttc	acc atc	tcc aga	gac aat	tcc aag	atc 288
acg ctg tat	ctg caa	atg aac	agc ctc	aga act	gag gac	acg gct	gtg 336
tat tac tgt	gcg aga	gat ggg	ggt ata	gca gca	cct ggg	cct gac	tac 384
tgg ggc cag	gga acc	ctg gtc	acc tcc	tcc tca	gca agt	acc aag	ggc 432
cca tcc gtc	tcc ccc	ctg gdg	ccc gct	agc aag	agc acc	tct ggg	ggc 480
aca gcg gcc	ctg ggc	tgc ctg	gtc aag	gac tac	tcc ccc	gaa ccg	gtg 528
acg gtg tgc	tgg aac	tca ggc	gcc ctg	acc agc	ggc gtg	cac acc	tcc 576
ccg gct gtc	cta cag	tcc tca	gga ctc	tac tcc	ctc agc	agg gtg	gtg 624
acc gtg ccc	tcc agc	ttg ggc	acc eac	cag acc	tac atc	tgc aac	gtg 672
aat cac aag	ccc agc	aac acc	aag gtg	gac aag	aga gtt	ggt gag	agg 720
cca gca cag	gga ggg	agg gtg	tct gct	gga agc	cag gct	cag cgc	tcc 768
tgc ctg gac	gca tcc	cggt cta	tgc agt	ccc agt	cca ggg	cag caa	ggc 816
agg ccc cgt	ctg cct	ttt cac	ccg gag	gcc tct	gcc egc	ccc act	cat 864
gtc cag gga	gag ggt	ctt ctg	gtc ttt	cca ggc	tct ggg	cag gca	912
cag gct agg	tgc ccc	taa ccc	agg ccc	tgc aca	caa agg	ggc agg	tgc 960
tgg gct cag	acc tgc	caa gag	cca tat	ccg gga	gga ccc	tgc ccc	tga 1008
cct aag ccc	acc cca	aag gcc	aaa ctc	ttc act	ccc tca	gtc ega	aca 1056
cet tct ctc	ctc cca	gat tcc	agt aac	tcc caa	tct tct	ctc tgc	aga 1104
gcc caa atc	ttg tga	caa aac	tca ccc	atg atg	ccc acc	gtg ccc	agg taa 1152
gcc agc cca	ggc ctc	gcc ccc	tcc cag	atc aag	gtg gga	cag gtg	ccc tag 1200
agt agc ctg	cat cca	ggg aca	ggc ccc	agc egg	gtg ctg	aca cgt	cca 1248
cct cca tct	ctt cct	cag cac	ctg aac	tcc tgg	ggg gac	cgt cag	tct 1296
tcc tct tcc	ccc caa	aac cca	agg aca	ccc tca	tga tct	ccc gga	ccc 1344
ctg agg tca	cat gcg	tgg tgg	tgg acg	tga gcc	acg aag	acc ctg	agg 1392
tca agt tca	act ggt	acg tgg	acg ggg	tgg agg	tgc ats	atg cca	aga 1440
caa agc cgc	ggg agg	agg agc	agt aca	aca gca	cgt acc	gtg tgg	tca gcg 1488
tcc tca ccc	ttc tcc	acc agg	act ggc	tga atg	gca agg	agt aca	agt 1536
gca agg tct	cca aca	aag ccc	tcc cag	ccc cca	tgc aga	aaa cca	tct 1584
cca aag cca	aag gtg	gga ccc	gtg ggg	tgc gag	ggc cac	atg gac	aga 1632
ggc cgg ctc	ggc cca	ccc tct	gcc ctg	aga gtg	acc gct	gtc cca	acc 1680
tct gtc cct	aca ggg	cag ccc	oga gaa	cca cag	gtg tac	acc ctg	ccc 1728
cca tcc cgg	gag gag	atg acc	aag aac	cag gtc	agc ctg	acc tgc	ctg 1776
gtc aaa ggc	ttc tat	ccc agc	gac atc	gcc gtg	gag tgg	gag agc	aat 1824
ggg cag ccc	gag aac	aac tac	aag acc	acg cct	ccc gtg	ctg gac	tcc 1872
gac ggc tcc	ttc ctc	tcc tat	agc aag	ctc acc	gtg gac	aag agc	agg 1920
tgg cag cag	ggg aac	gtc ttc	tca tgc	tcc gtg	atg cat	gag gct	ctg 1968
cac aac cac	tac acg	aag agc	ctc tcc	ctg tet	ccg ggt	aaa tga	2016

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Cadeia pesada de anticorpo anti-Cd40 humano 12.12

<400> 4

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

50	55	60
Glu	Tyr	Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile		80
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr		
115	120	125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
130	135	140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
145	150	155
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		160
165	170	175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
180	185	190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
210	215	220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys		
225	230	235
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		240
245	250	255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
260	265	270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
275	280	285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
290	295	300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
305	310	315
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		320
325	330	335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
340	345	350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
355	360	365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
370	375	380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
385	390	395
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		400
405	410	415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
420	425	430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
435	440	445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
450	455	460
Leu Ser Pro Gly Lys		
465		

<210> 5
<211> 469
<212> PRT
<213> Seqüência artificial

<220>
<223> Cadeia pesada de variante de anticorpo anti-CD40 humano
12.12

<400> 5
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
1 5 10 15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln

20	25	30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe		
35	40	45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala		
65	70	75
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile		
85	90	95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val		
100	105	110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr		
115	120	125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly		
130	135	140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly		
145	150	155
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val		
165	170	175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe		
180	185	190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
210	215	220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys		
225	230	235
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
245	250	255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
260	265	270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
275	280	285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
290	295	300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
305	310	315
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
325	330	335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
340	345	350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
355	360	365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
370	375	380
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
385	390	395
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
405	410	415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
420	425	430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
435	440	445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
450	455	460
Leu Ser Pro Gly Lys		
465		

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

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(612)

<221> Características_misc

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

<223> Seqüência codificadora para isoforma curta de CD40 humano

<400> 6

atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr	48
1 5 10 15	
gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu	96
20 25 30	
ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val	144
35 40 45	
agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu	192
50 55 60	
agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His	240
65 70 75 80	
aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr	288
85 90 95	
tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr	336
100 105 110	
agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctc cac cgc tca tgc tcg ccc ggc Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly	384
115 120 125	
ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	432
130 135 140	
ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	480
145 150 155 160	
tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tcg gct gag agc cct ggt ggt Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly	528
165 170 175	
gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly	576
180 185 190	
ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa ggc aac caa taa Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *	612
195 200	

<210> 7

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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	Arg	Ser	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Gly
						165			170				175		
Asp	Pro	His	His	Leu	Arg	Asp	Pro	Val	Cys	His	Pro	Leu	Gly	Ala	Gly
						180			185				190		
Leu	Tyr	Gln	Lys	Gly	Gly	Gln	Glu	Ala	Asn	Gln					
						195			200						

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

<220>
<221> CDS
<222> (1) ... (834)

<221> Características_misc
<222> (0)...(0)
<223> Seqüência codificadora para isoforma longa de CD40 humano

<400> B				
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc				48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr				
1	5	10	15	
 gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta				96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu				
20	25	30		
 ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg				144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val				
35	40	45		
 agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa				192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu				
50	55	60		
 agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac				240
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His				
65	70	75	80	
 aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc				288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr				
85	90	95		
 tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg				336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr				
100	105	110		
 agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc				384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly				

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

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

<400> 9
 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

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, em que o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), o método caracterizado por compreender a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é selecionada do grupo que consiste em lúpus eritematoso disseminado (SLE), lúpus discóide, nefrite de lúpus, sarcoidose, artrite 15 inflamatória incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante, artrite da gota, rejeição de transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crônica e/ou enxerto versus doença do hospedeiro, esclerose múltipla, 20 síndrome de hiper IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, doença celíaca (enteropatia sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoriase, escleroderma, miastenia grave, púrpura 25 trombocitopênica autoimune, tireoidite autoimune, doença de Grave, tireoidite de Hashimoto, doença do complexo imune, síndrome da disfunção imune de fadiga crônica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinemia, trombólise, cardiomiopatia, pênfigo vulgar, fibrose intersticial 30 pulmonar, diabetes mellitus tipo I e tipo II,

hipersensibilidade tipo retardada tipo 1, 2, 3 e 4, alergia ou distúrbios alérgicos, respostas imunes indesejadas a proteínas terapêuticas, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite de contato irritante e alérgica, urticária, alergia mediada por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer's e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, inflamação pulmonar incluindo, sem limitação, rejeição a enxerto pulmonar, asma, sarcoidose, enfisema, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquite crônica, rinite alérgica e doenças alérgicas do pulmão como pneumonite de hipersensibilidade, pneumonia eosinofílica, bronquiolite obliterante devido à transplante de medula óssea e/ou pulmonar ou outras causas, aterosclerose de enxerto/flebosclerose de enxerto, fibrose pulmonar que resulta de doenças do colágeno, vasculares e doenças autoimunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é uma doença inflamatória ou doença autoimune associada a células que expressam CD20.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é artrite reumatóide, psoriase, lúpus eritematoso disseminado, doença de Crohn, miastenia grave, púrpura trombocitopênica idiopática ou síndrome de Sjogren.

5. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a referida doença

inflamatória ou doença autoimune é esclerose múltipla, rejeição a enxerto, enxerto versus doença do hospedeiro, doença de Alzheimer, ou diabetes.

6. Método, de acordo com a reivindicação 3,
5 caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam tanto CD40 quanto CD20.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6,
10 caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é artrite reumatóide, psoríase, lúpus eritematoso disseminado, doença de Crohn, miastenia grave, púrpura trombocitopênica idiopática, ou síndrome de Sjogren.

15 8. Método, de acordo com a reivindicação 6,
caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é esclerose múltipla, rejeição a enxerto, enxerto versus doença do hospedeiro, doença de Alzheimer, ou diabetes.

20 9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é administrado por uma via de administração parenteral.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9,
25 caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é administrado por via intravenosa ou subcutânea.

11. Uso de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40
30 caracterizado por ser para a manufatura de um medicamento para o tratamento de uma doença inflamatória ou doença

autoimune que está associada a células que expressam CD40 em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F).

12. Uso, de acordo com a reivindicação 11,
5 caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é selecionada do grupo que consiste em lúpus eritematoso disseminado (SLE), lúpus discóide, nefrite de lúpus, sarcoidose, artrite inflamatória incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide,
10 artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante, artrite da gota, rejeição de transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crônica e/ou enxerto versus doença do hospedeiro, esclerose múltipla, síndrome de hiper IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar
15 primária, doença inflamatória intestinal, doença de Crohn, doença celíaca (enteropatia sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoriase, escleroderma, miastenia grave, púrpura trombocitopênica autoimune, tireoidite autoimune, doença de
20 Grave, tireoidite de Hashimoto, doença do complexo imune, síndrome da disfunção imune de fadiga crônica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinemia, trombólise, cardiomiopatia, pênfigo vulgar, fibrose intersticial pulmonar, diabetes mellitus tipo I e tipo II,
25 hipersensibilidade tipo retardada tipo 1, 2, 3 e 4, alergia ou distúrbios alérgicos, respostas imunes indesejadas a proteínas terapêuticas, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite de contato irritante e alérgica, urticária, alergia mediada por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias

idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer's e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica, inflamação pulmonar incluindo, sem limitação, rejeição a enxerto pulmonar, asma, sarcoidose, enfisema, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquite crônica, rinite alérgica e doenças alérgicas do pulmão como pneumonite de hipersensibilidade, pneumonia eosinofílica, bronquiolite obliterante devido à transplante de medula óssea e/ou pulmonar ou outras causas, aterosclerose de enxerto/flebosclerose de enxerto, bem como fibrose pulmonar que resulta de doenças do colágeno, vasculares e doenças autoimunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é uma doença inflamatória ou doença autoimune associada a células que expressam CD20.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é artrite reumatóide, psoriase, lúpus eritematoso disseminado, doença de Crohn, miastenia grave, púrpura trombocitopênica idiopática, ou síndrome de Sjogren.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é esclerose múltipla, rejeição a enxerto, enxerto versus doença do hospedeiro, doença de Alzheimer, ou diabetes.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é uma doença inflamatória

ou doença autoimune que está associada a células que expressam tanto CD40 quanto CD20.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida doença 5 inflamatória ou doença autoimune é artrite reumatóide, psoríase, lúpus eritematoso disseminado, doença de Crohn, miastenia grave, púrpura trombocitopênica idiopática, ou síndrome de Sjogren.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 16, 10 caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é esclerose múltipla, rejeição a enxerto, enxerto versus doença do hospedeiro, doença de Alzheimer, ou diabetes.

19. Uso, de acordo com qualquer uma das 15 reivindicações 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é formulado para administração por uma via de administração parenteral.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 19, 20 caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é formulado para administração por via intravenosa ou subcutânea.

21. Método para a inibição de produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou 25 homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), caracterizado que compreende a administração ao referido paciente humano de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD40.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, 30 caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano

tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40.

23. Uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CD40 caracterizado por ser para a manufatura de um medicamento para a inibição de produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (V/F ou F/F).

24. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 10 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é um anticorpo monoclonal humano.

25. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 humano compreende uma região constante de cadeia pesada de IgG1 humana.

26. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25, 20 caracterizado pelo fato de que a referida IgG1 humana compreende a seqüência de aminoácidos apresentada em Id. de Seq. N°:4 ou Id. de Seq. N°:5.

27. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 25 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou 26, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é livre de significante atividade agonista.

28. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 30 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 ou 27,

caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é um antagonista de sinalização de CD40-CD40L em células que expressão CD40.

29. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das 5 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 ou 28, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é selecionada do grupo que consiste em:

a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12;

10 b) p anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12;

c) um anticorpo monoclonal que compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:2, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:4, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:5, ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:4, e ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:2 e Id. de Seq. N°:5;

d) um anticorpo monoclonal que tem uma seqüência de 20 aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucleico que compreende uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste na seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:1, a seqüência mostrada em Id. de Seq. N°:3, e ambas seqüências mostradas em Id. de Seq. N°:1 e Id. de Seq. 25 N°:3;

e) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 12.12;

f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo 30 que compreende resíduos 82-87 da seqüência de CD40 humano

mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;

g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende resíduos 82-89 da seqüência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;

5 h) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 em um ensaio de ligação competitivo;

i) o anticorpo monoclonal do item anterior a) ou um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores 10 c)-h), em que o referido anticorpo é recombinantemente produzido; e

j) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens anteriores a)-i), em que o referido fragmento 15 retém a capacidade de se ligar especificamente a antígeno humano CD40.

30. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-
CD40 é o anticorpo monoclonal CHIR-12.12.

20 31. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o referido fragmento de
ligação a antígeno é selecionada do grupo que consiste em
um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento Fv e
um fragmento Fv de cadeia única.

25 32. Método para identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), caracterizado por compreender:

30 a) a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada

a células que expressam CD40; e

b) a determinação do referido genótipo Fc γ RIIIa-158 do paciente humano (VN, V/F ou F/F);

em que a referida doença inflamatória ou doença autoimune é tratável com um anticorpo anti-CD40 se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa158F (genótipo V/F ou F/F).

33. Método para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$), caracterizado por compreender:

a) a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$); e

b) a determinação do referido genótipo Fc γ RIIIa-158 do paciente humano (VN, V/F ou F/F);

em que se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento da referida doença inflamatória ou doença autoimune.

34. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 25 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é refratário a uma terapia para uma doença inflamatória ou autoimune.

35. Método, de acordo com a reivindicação 34, 30 caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é

refratário a uma terapia com um anticorpo monoclonal anti-CD20.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é 5 resistente a terapia com um anticorpo monoclonal anti-CD20.

37. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é não responsivo a terapia com um anticorpo monoclonal anti-CD20.

10 38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 35, 36 ou 37, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD20 é rituximab (Rituxin®).

39. Kit para identificação de um paciente humano com 15 uma doença inflamatória ou doença autoimune tratável com um anticorpo anti-CD40, caracterizado por compreender reagentes para a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

40. Kit para a seleção de uma terapia com anticorpo 20 para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que é associada com células que expressam CD40, caracterizado por compreender reagentes para determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

25 41. Kit, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado por incluir um micro-arranjo que compreende pelo menos um marcador de 10 ou mais nucleotídeos de comprimento e de uma seqüência adequada para a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

30 42. Kit, de acordo com a reivindicação 39 ou 40,

caracterizado por compreender oligonucleotídeos adequados para uso como iniciadores em amplificação catalisada por polimerase da região genômica que codifica aminoácido 158 de Fc γ RIIIa.

5 43. Kit, de acordo com a reivindicação 39 ou 40, caracterizado por compreender uma ou mais enzimas de restrição adequadas para a determinação do genótipo Fc γ RIIIa-158 de um paciente humano.

10 44. Método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, o método caracterizado por compreender a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo 15 que o anticorpo anti-CD40 não seja significativamente internalizado por células que expressam CD40 após a administração.

20 45. Método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, o método caracterizado por compreender a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo 25 que o anticorpo anti-CD40 permaneça substancialmente uniformemente distribuído na superfície de células que expressam CD40 após administração.

30 46. Método para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40, o método caracterizado por compreender a administração ao referido

paciente humano um anticorpo anti-CD40, de modo que uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 esteja presente na superfície de células que expressam CD40 no referido paciente humano após 5 administração.

47. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o 10 referido método ou uso resulta em citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam CD40 por células killer naturais (NK) que expressam Fc γ R_{IIIA} de um paciente humano.

48. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das 15 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é mais potente que rituximab 20 (Rituxin[®]) em um ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), em que o ensaio compreende a incubação de células que expressam CD40 e células que expressam CD20 com células killer naturais (NK) isoladas humanas na presença do anticorpo relevante.

49. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das 25 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é mais potente que rituximab 30 (Rituxin[®]) em um modelo de lúpus eritematoso disseminado (SLE), esclerose múltipla, inflamação e aterosclerose,

transplante ou doença de Alzheimer.

50. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 se liga a CD40 humano com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 10^{-6} M a pelo menos cerca de 10^{-12} M.

51. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das 10 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 se liga a Fc γ RIIIa-158V humano com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 0,5 μ M.

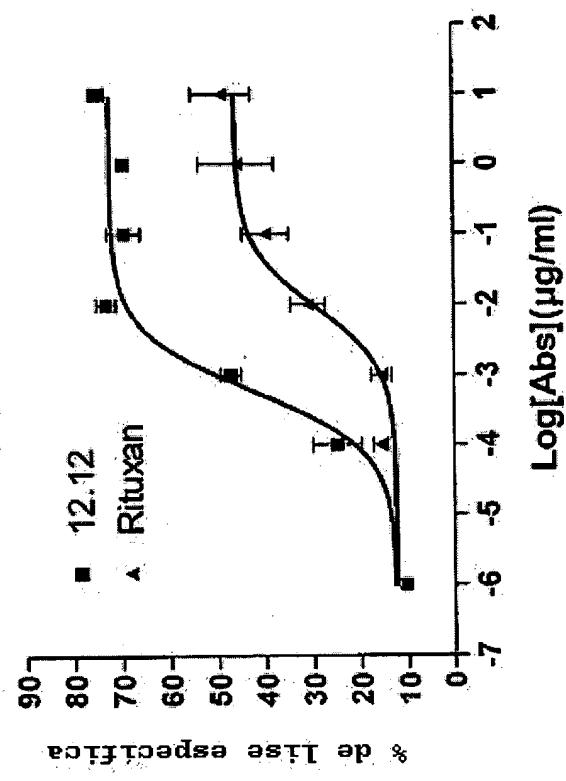
52. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 se liga a Fc γ RIIIa-158F humano 20 com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 12 μ M.

53. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 44, 45, 46, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 se liga a Fc γ RIIIa-158V humano 25 com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 0,5 μ M, e se liga a Fc γ RIIIa-158F humano com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 12 μ M.

Figura 1A

ADCC-029 (linha de células de linfoma de Daudi)

Anti-CD40Abs mata células Daudi
com pM EC50

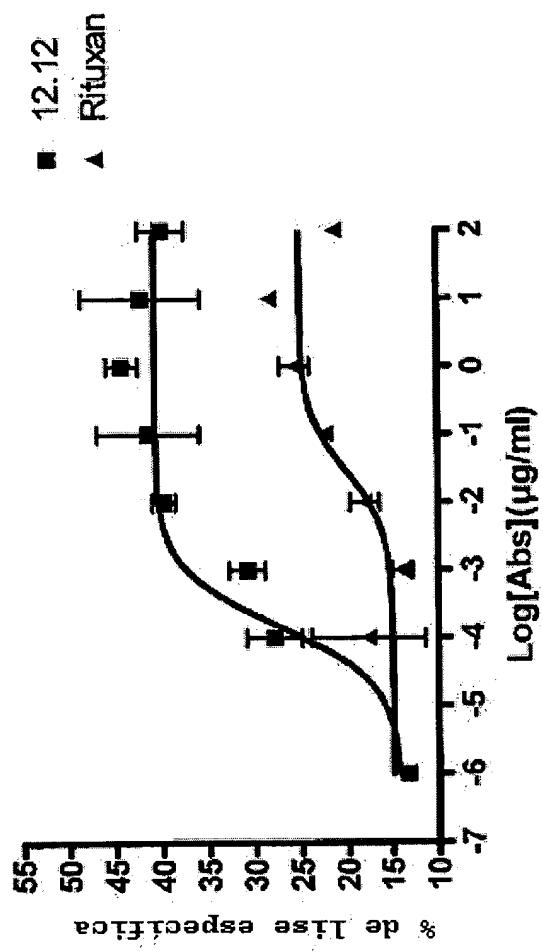


ED50 de 12.12: 4.07pM; Rituxan: 66.93pM

Figura 1B

ADCC-036 (linha de células de linfoma Namalwa)

Atividade de morte por ADCC de anti-CD40Abs em células Namalwa com pM EC50

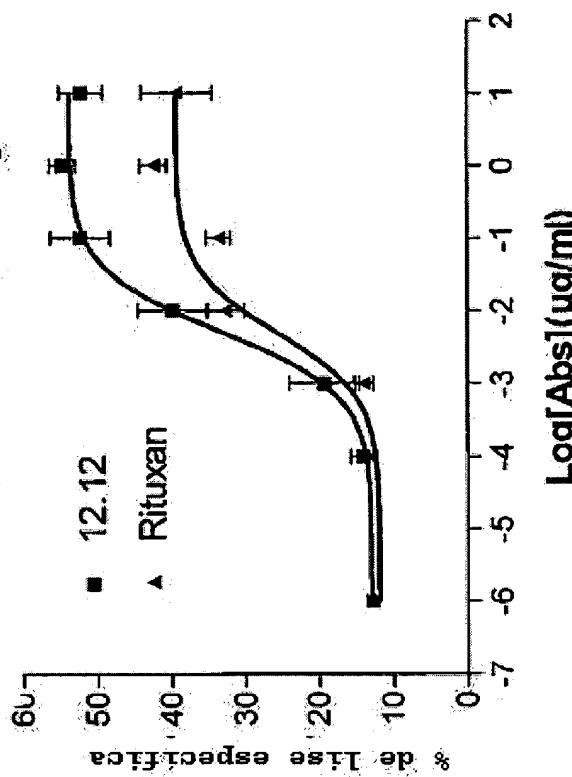


EC50 de 12.12; 1.01 pM; Rituxan: 189.72 pM

Figura 1C

ADCC-028 (linha de células de mieloma múltiplo ARH77)

atividade de morte por ADCC de anti-CD40Abs
em células ARH77 com pM EC50



ED₅₀ de 12.12; 36.24pM; Rituxan: 34.77pM

Figura 1D

ADCC-041 (linha de células de mieloma múltiplo IM-9)

atividade de morte por ADCC em células IM-9 com pm EC50

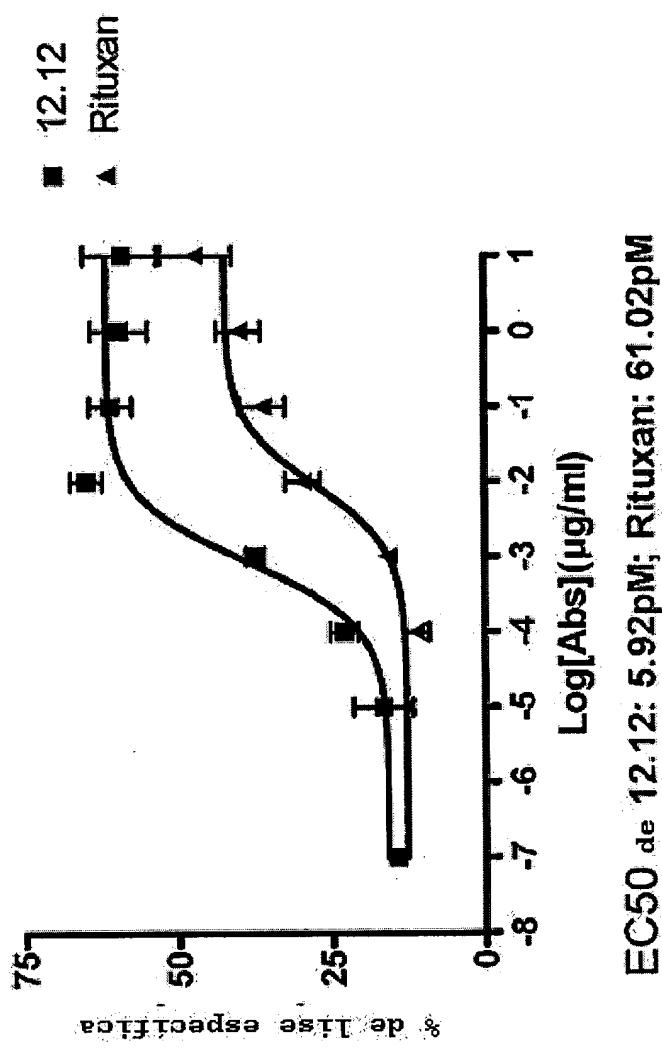
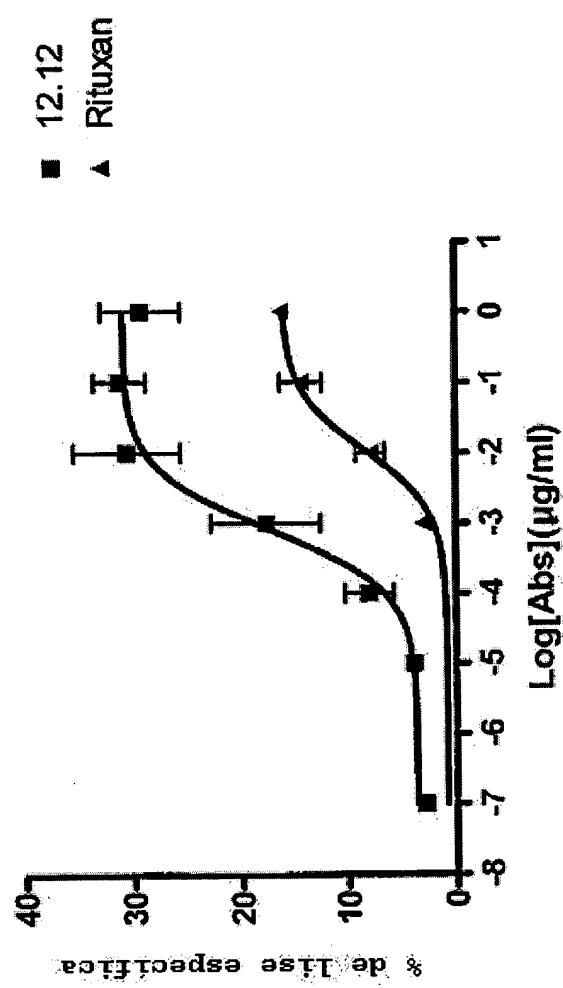


Figura 1E

ADCC-056 (EHEB, linha de células B-CLL)

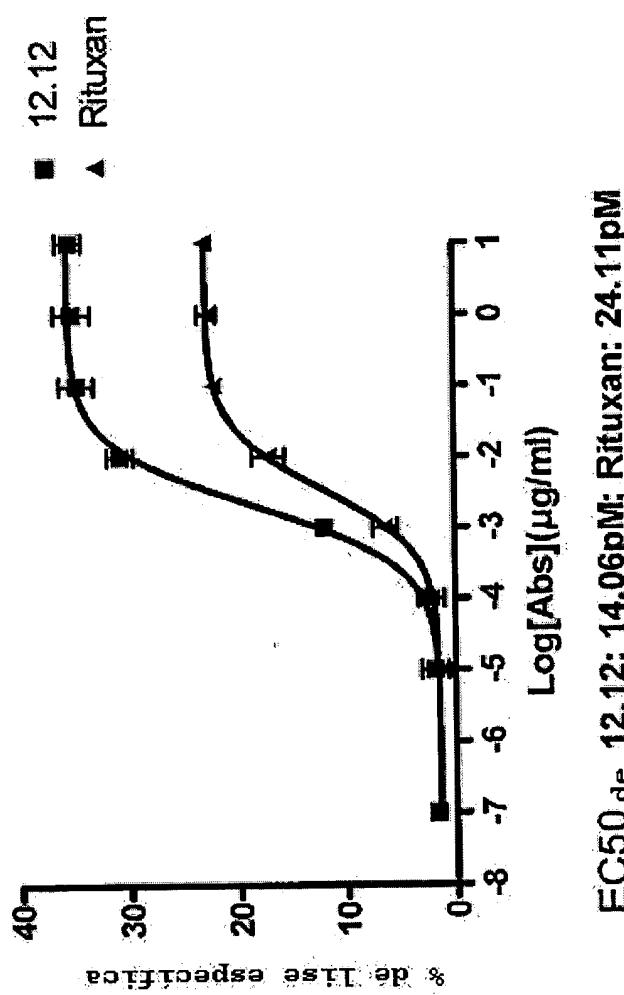
Atividade de ADCC-056 em células EHEB com pM EC50



EC50 de 12.12: 5.56pM; Rituxan: 76.43pM

Figura 1F

ADCC-069 (CCRF-SB, linha de células B-ALL)
Atividade de morte por ADCC em células CCRF-SB com pM EC50



EC50 de 12.12: 14.06pM; Rituxan: 24.11pM

Figura 2A: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de pacientes com CLL

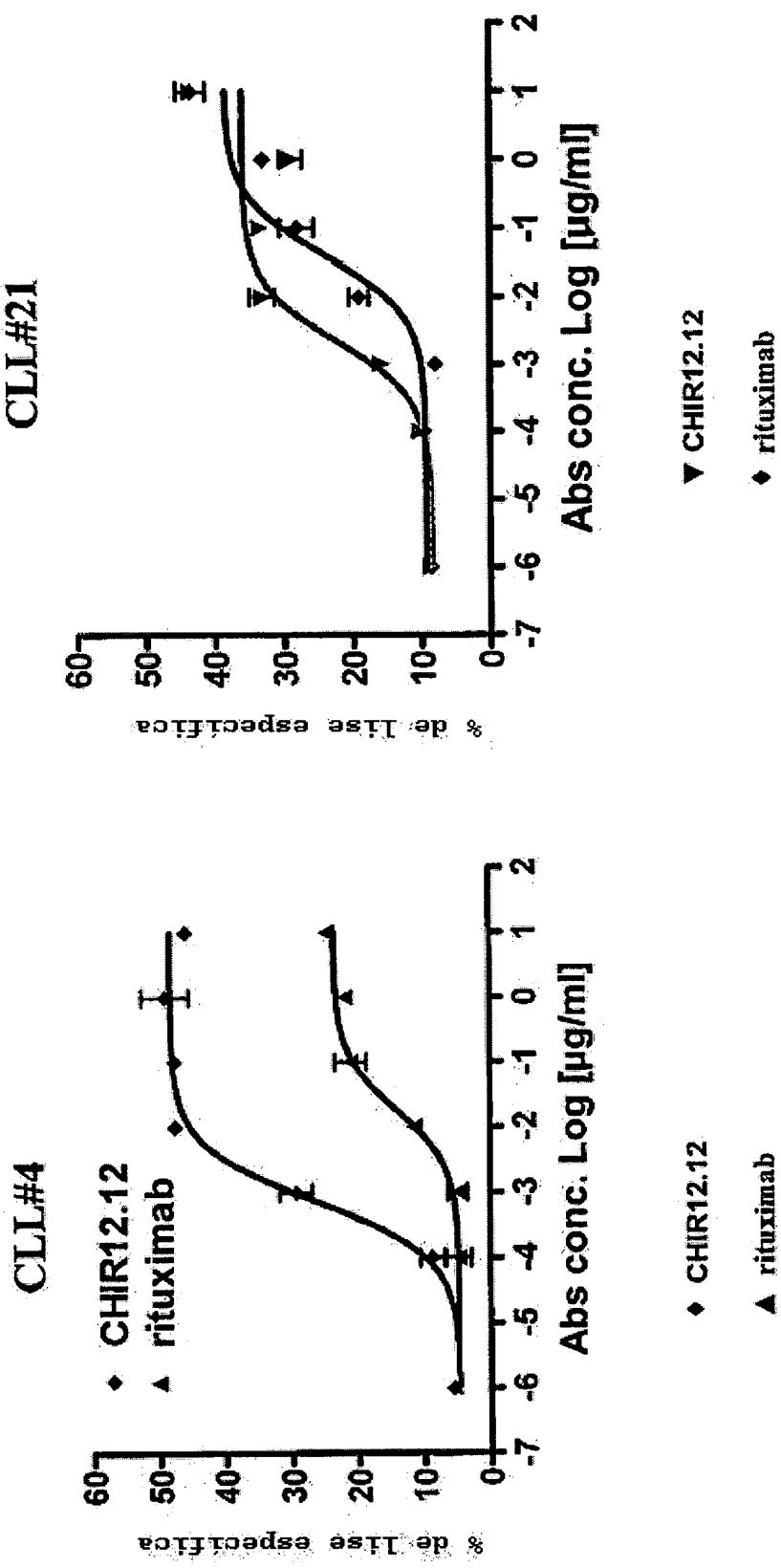


Figura 2B: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de paciente com CLL.

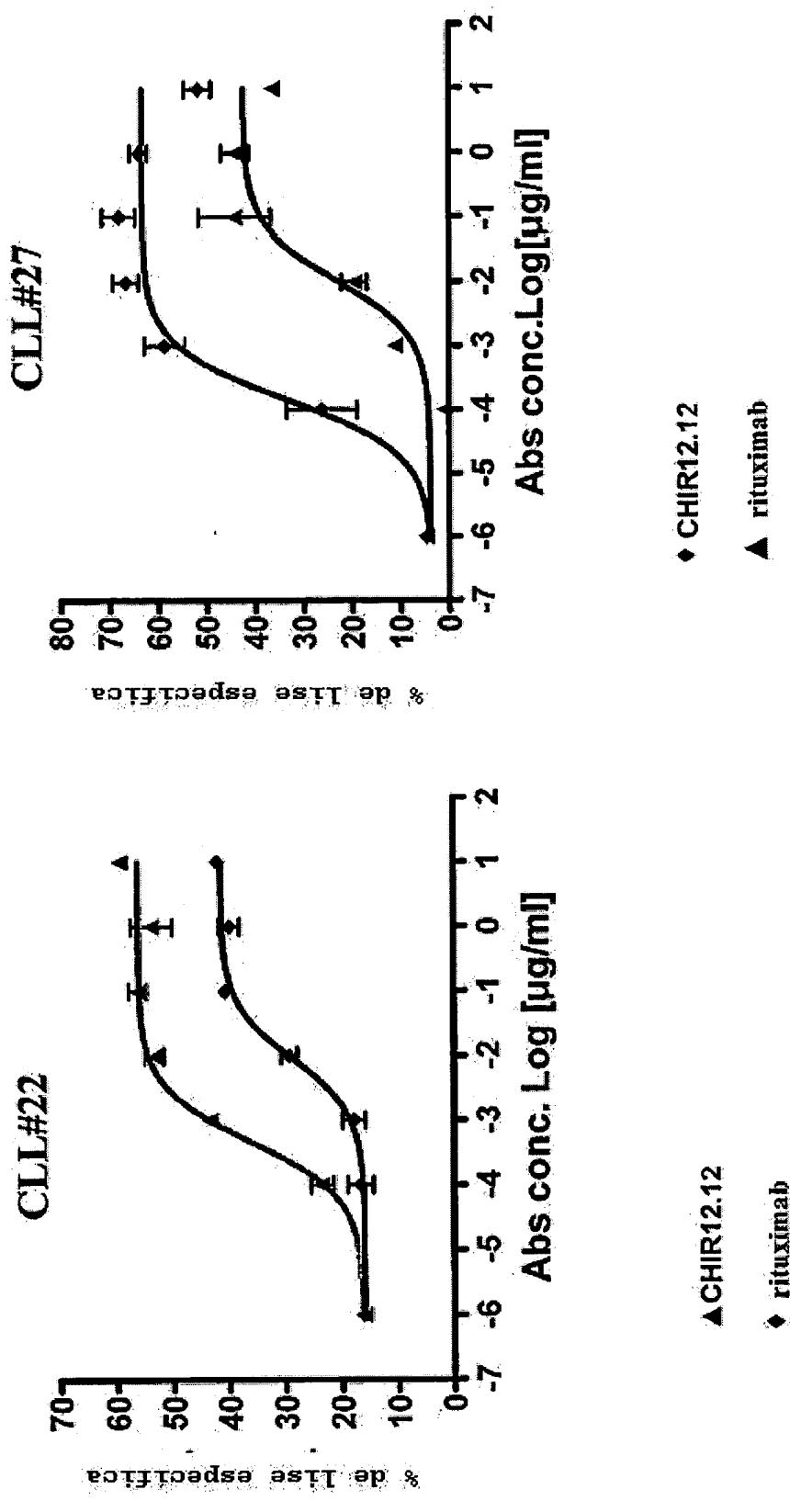


Figura 2C: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de paciente com CLL

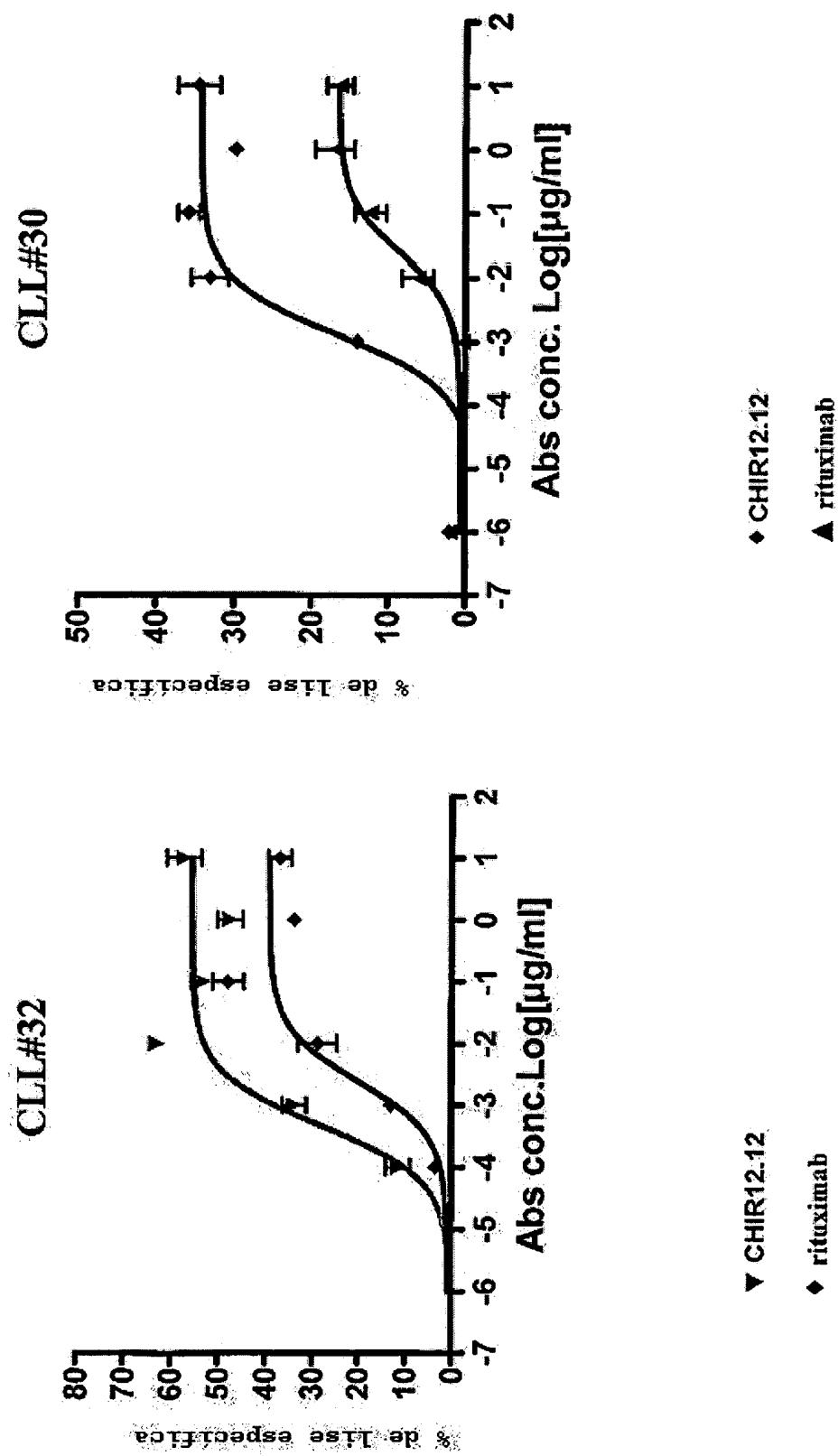


Figura 2D: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de paciente com CLL

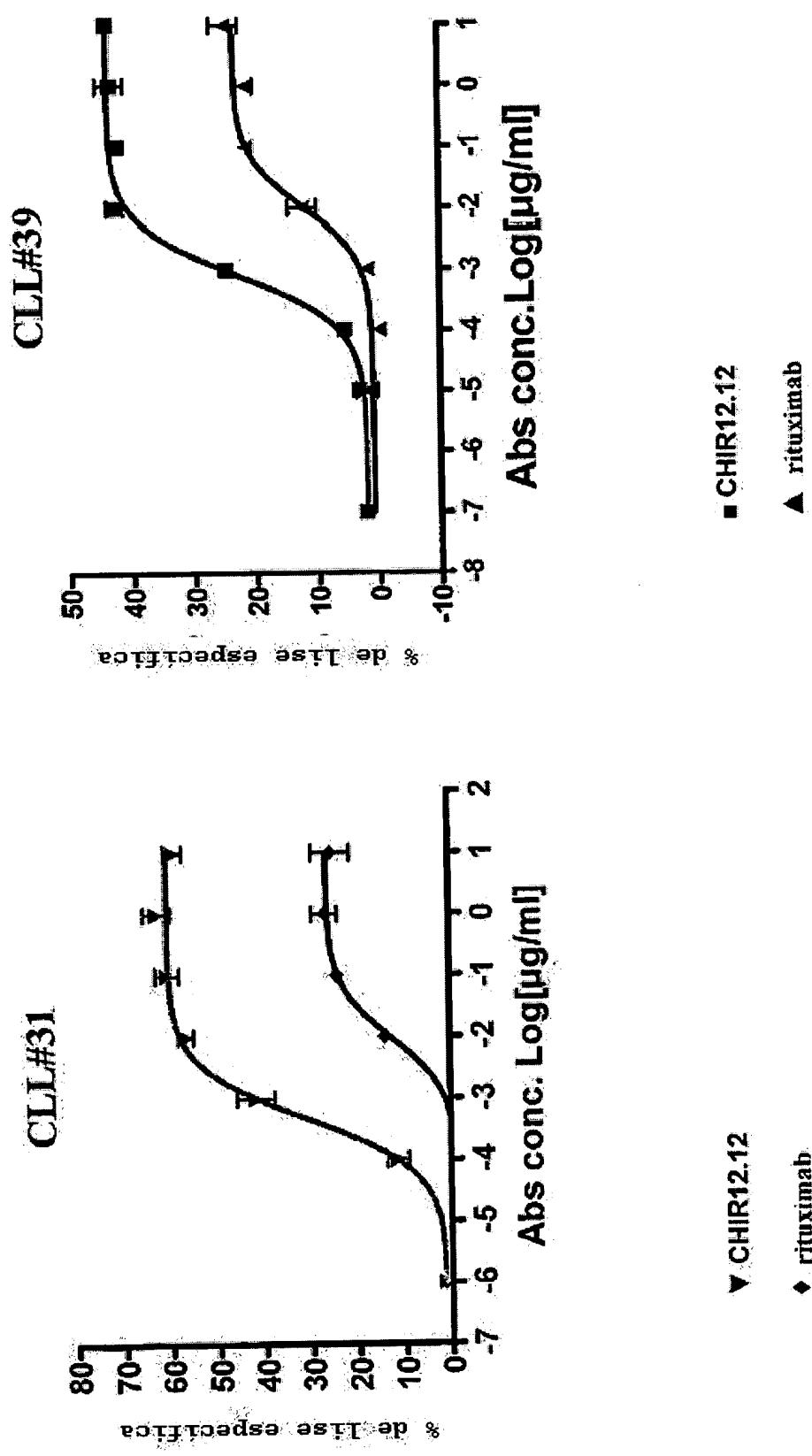


Figura 3: ADCC comparativo de CHIR-12.12 e rituximab contra células de pacientes com CLL (n=9) por células NK humanas de doadores múltiplos

		Fração de lise mediada por rituximab comparada a CHIR-12.12	CHIR-12.12 EC50(pM)
Abs	conc.(ug/ml)		Rituximab EC50(pM)
10	0.57 ± 0.18		
1	0.62 ± 0.24		
0.1	0.56 ± 0.21	13.25 ± 16.73	147.22 ± 135.6
0.01	0.29 ± 0.14		
0.001	0.14 ± 0.11		
0.0001	0.71 ± 2.18		
0.00001	-0.45 ± 0.49		

Figura 4: Variação de doador de NK em atividades de ADCC nas mesmas células alvo (CLL#33)

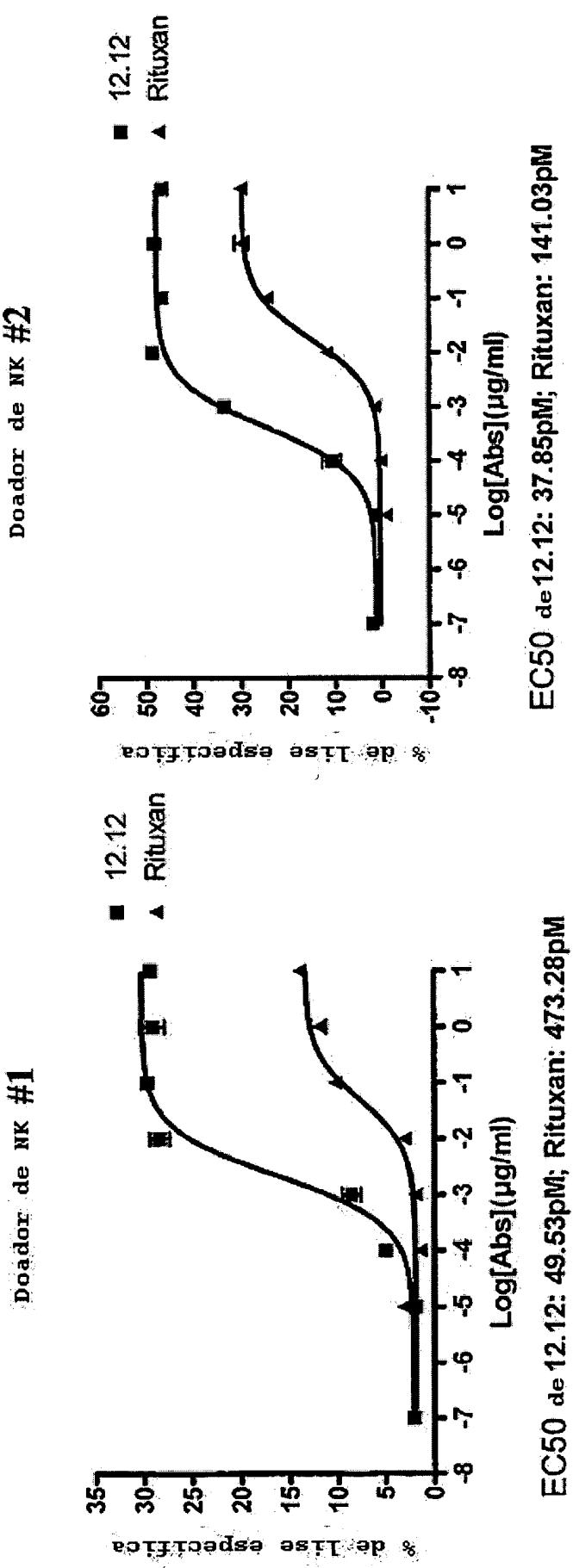


Figura 5: Quantificação de moléculas de CD40 e CD20 expressas em células de pacientes com CLL e células b normais

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

Figura 6: Expressão relativa de moléculas de CD40 e CD20 em células de paciente com CLL e atividade de ADCC

Paciente com LCC #	CHIR-12.12	% de lise máxima		Proporção de moléculas alvo CD20/CD40
		Rituximab	Diferença entre CHIR-12.12 e Rituximab	
4	46.35	20.15	26.2	N/A
21	32.9	32.8	0.1	N/A
22	46.65	31.08	15.57	N/A
27	79.87	56.04	23.83	1.26
32	56.92	49.97	6.95	9.96
30	37.6	21.33	16.27	14.01
31	63.4	27.27	36.13	4.3
33(1)	27.71	12.33	15.38	
33(2)	48.57	28.63	19.94	4.08
39	44.18	21.13	23.05	N/A
SD médio	48.42 15.27	30.07 13.57		

Figura 7: Níveis de CHIR-12.12 ligado à superfície celular (medido como intensidade de fluorescência) depois de 3 horas de incubação a 4°C e 37°C

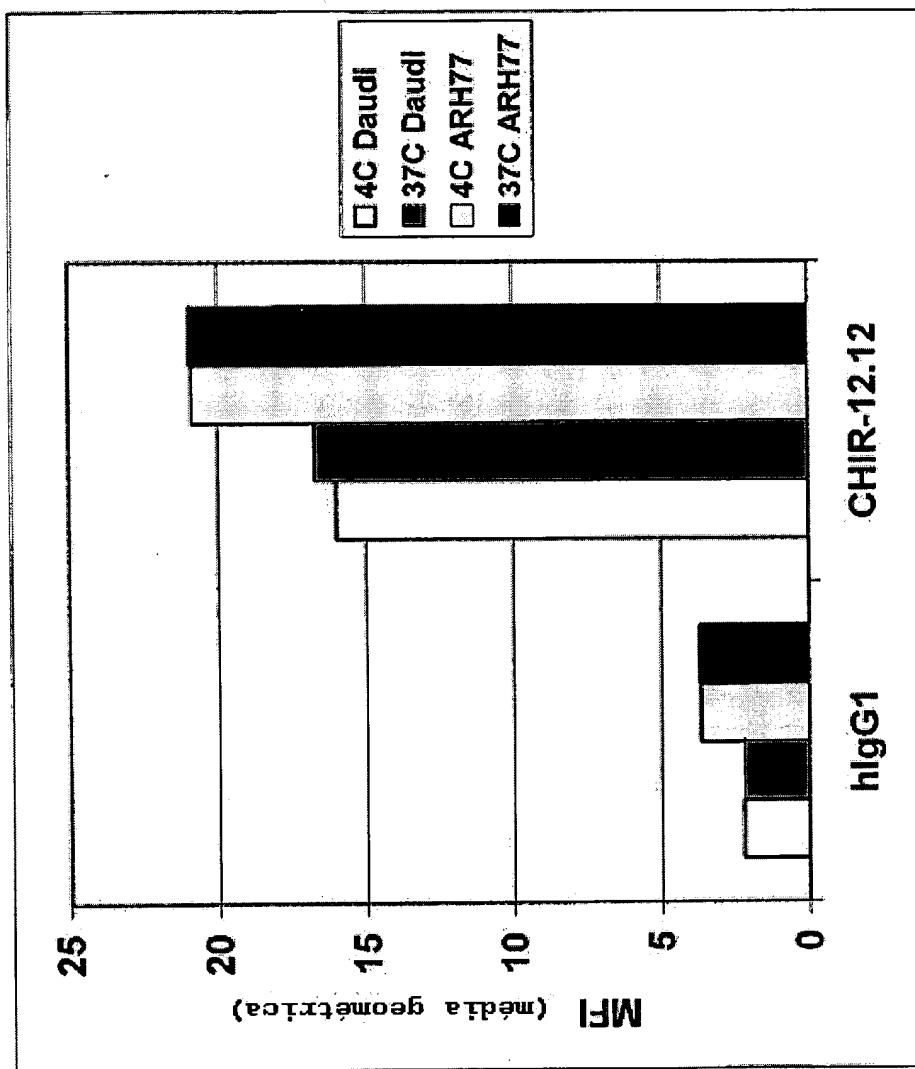
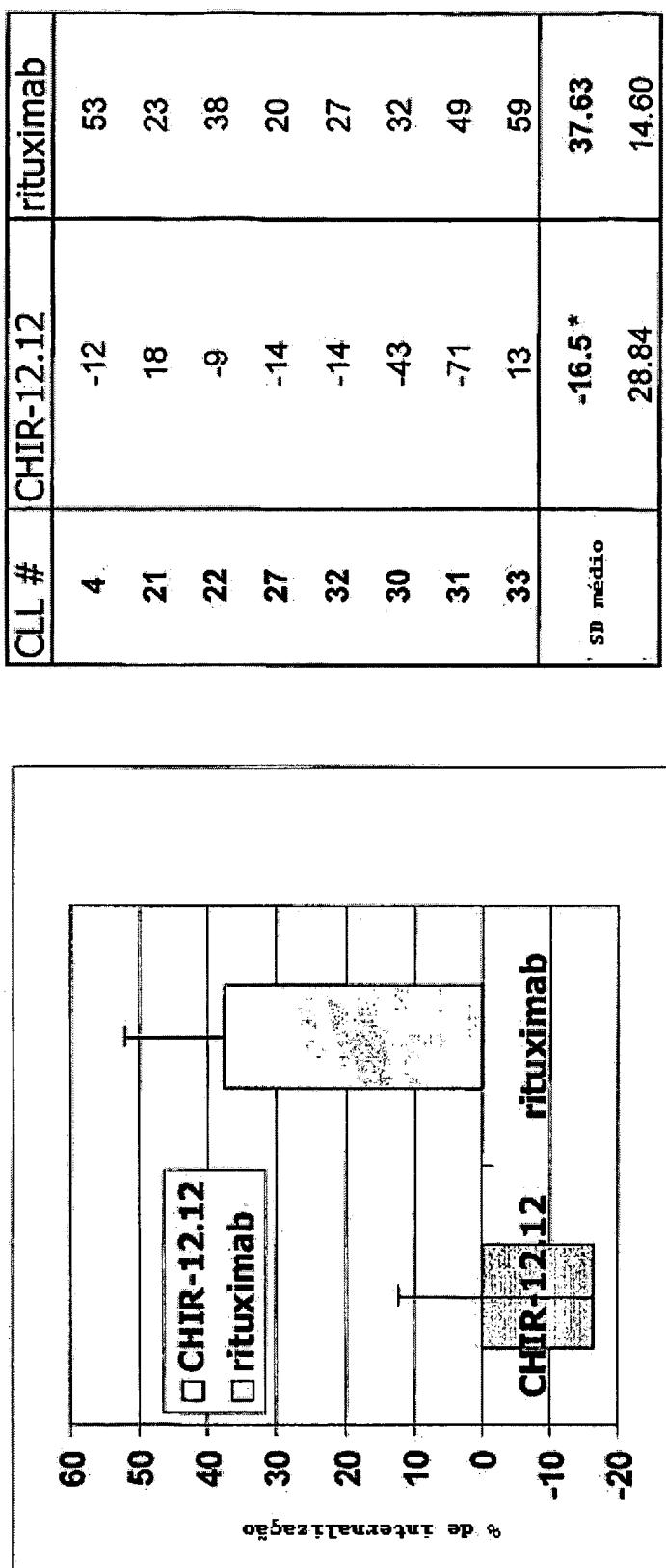


Figura 8: Percentagem de internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células de pacientes com CLL (n=8) :FAC



% de internalização = $100 \times \left(\frac{\text{GMF de Abs de teste a } 4^{\circ}\text{C} - \text{GMF a } 4^{\circ}\text{C}}{\text{GMF de Abs de teste a } 37^{\circ}\text{C} - \text{GMF a } 4^{\circ}\text{C}} \right)$

GMF: média geométrica de intensidade de Fluorescência

* % negativo de internalização indica maior ligação de CHIR-12.12 a sítio comparado a 4°C

Figura 9: Internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células B humanas normais: microscopia confocal

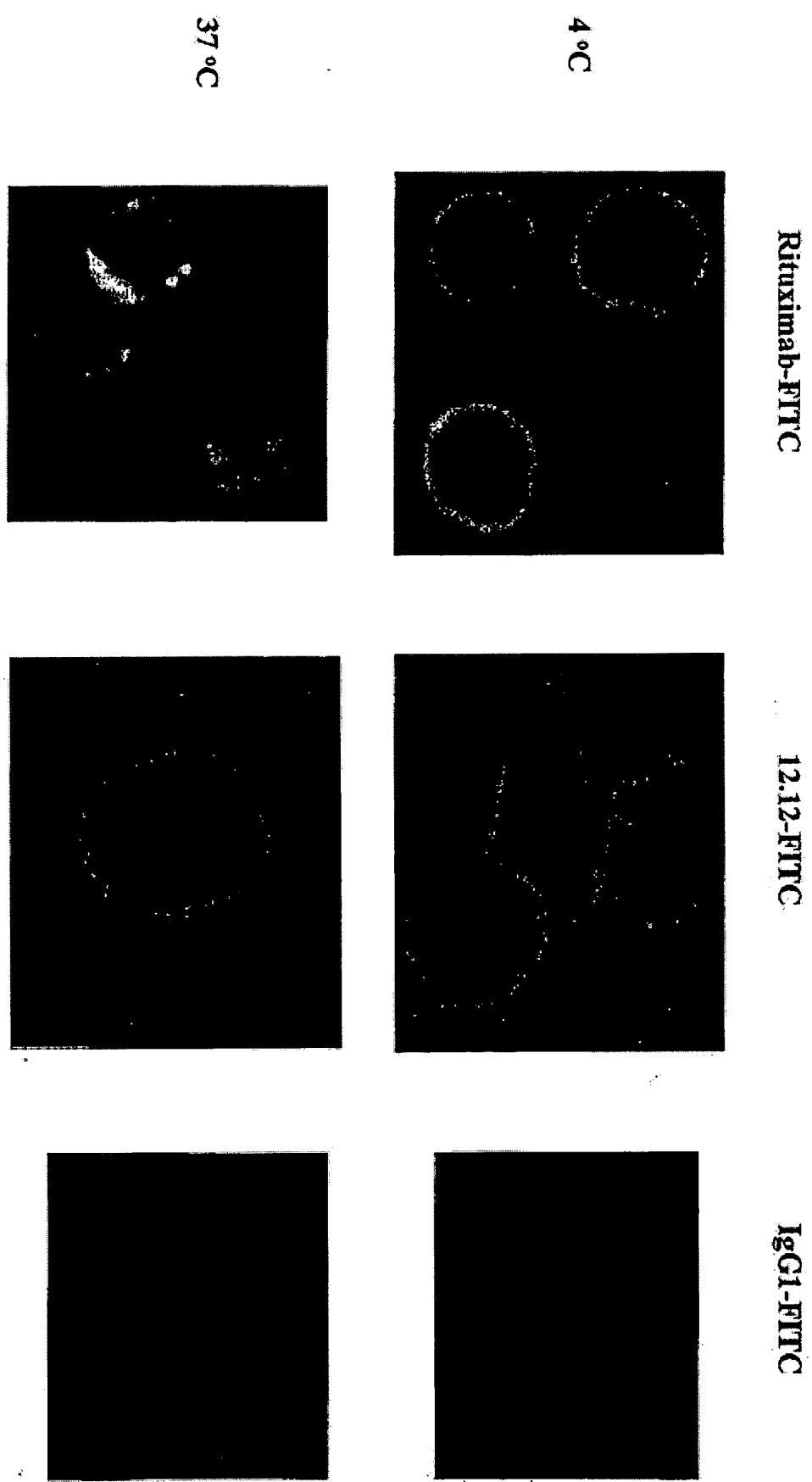


Figura 10: Internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células de paciente com CLL#33:
microscopia confocal

Rituximab-Alexa488

12.12- Alexa488

IgG1- Alexa488

4°C

37 °C

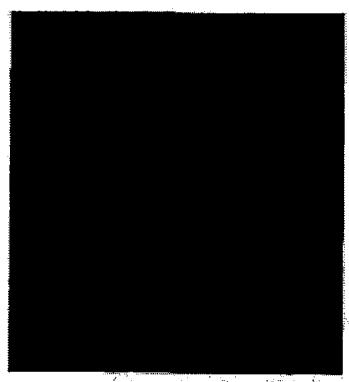
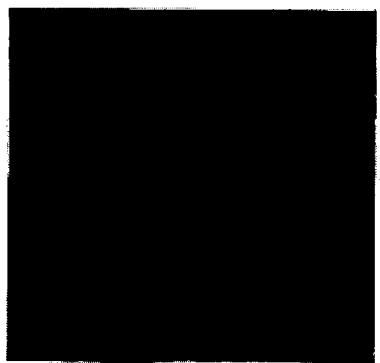
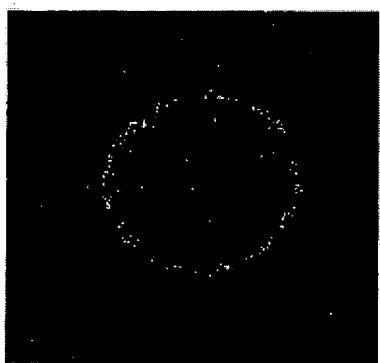
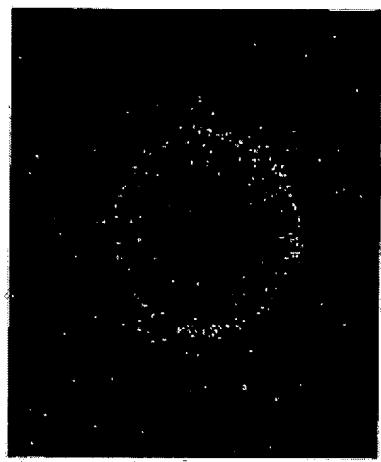
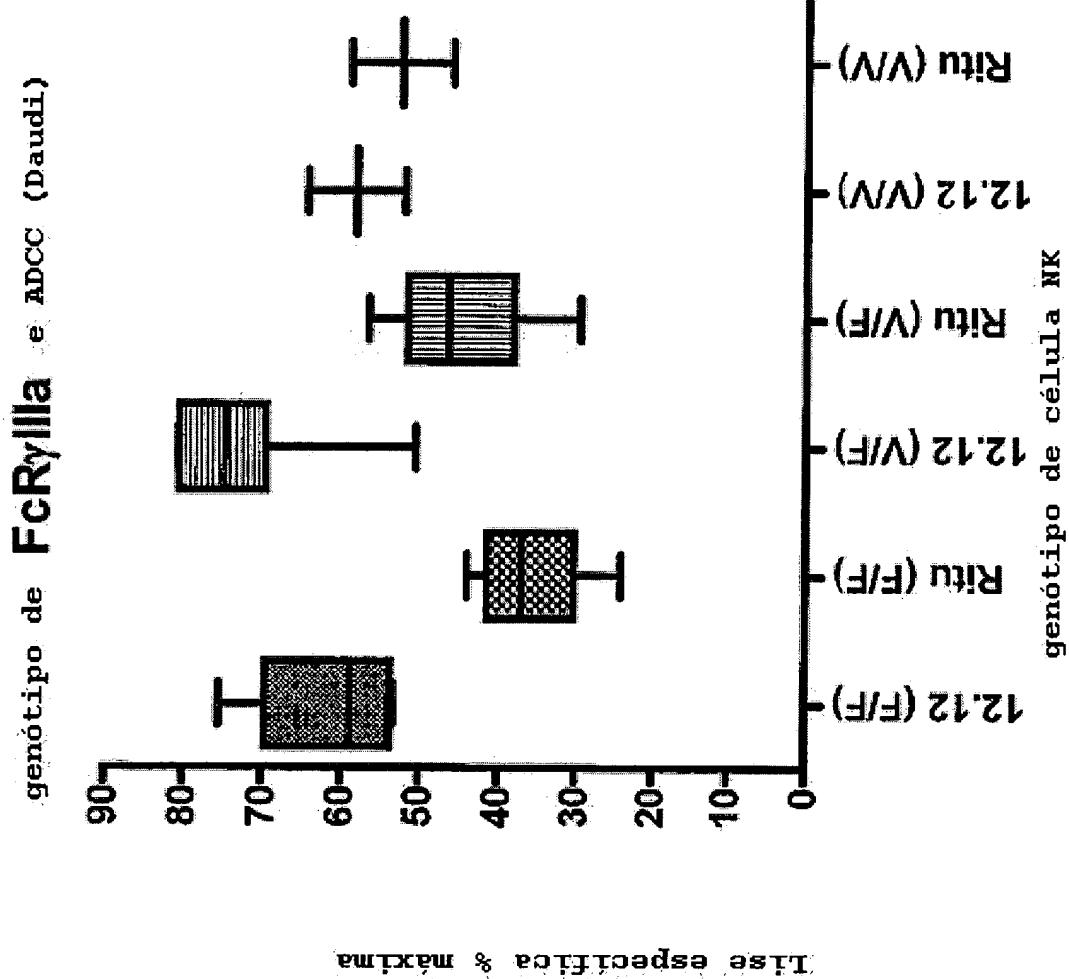


Figura 11: Relação entre atividade de ADCC e internalização

Paciente com CLL #	#	% de lise máxima		Diferença entre CHIR-12.12 e Rituximab	% de Internalização
		CHIR-12.12	Rituximab		
4		46.35	20.15	26.2	No
21		32.9	32.8	0.1	18
22		46.65	31.08	15.57	No
27		79.87	56.04	23.83	No
32		56.92	49.97	6.95	No
30		37.6	21.33	16.27	No
31		63.4	27.27	36.13	No
33(1)		27.71	12.33	15.38	No
33(2)		48.57	28.63	19.94	59
39		44.18	21.13	23.05	N/A

Figura 12



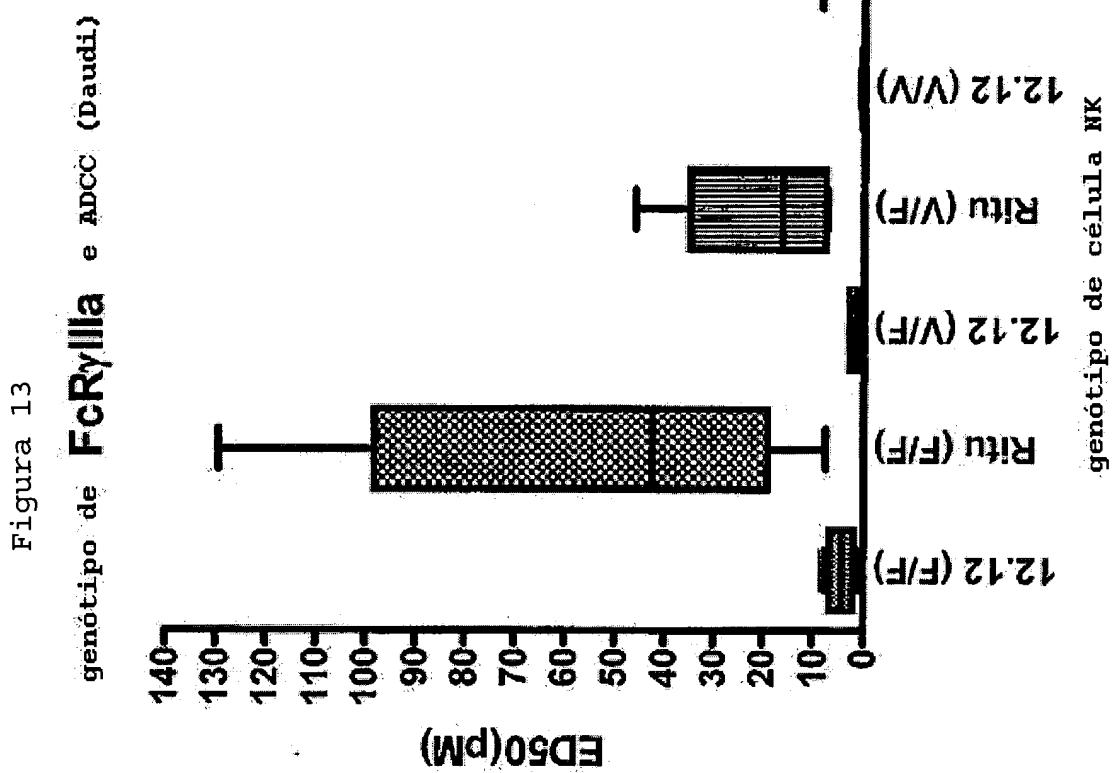


Figura 14: ADCC comparativa de CHIR-12.12 e rituximab contra células de paciente com CLL (n=9) por células NK humanas de doadores múltiplos com genótipo de FcγIIIa variante

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

PT0618217-8

USOS DE ANTICORPOS ANTI-CD40

Métodos para o tratamento de um paciente humano para uma doença inflamatória ou doença autoimune que está associada a células que expressam CD40 são fornecidos, em 5 que o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). também são fornecidos métodos de inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano que é heterozigótico ou homozigótico para Fc γ RIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Os métodos 10 compreendendo a administração ao paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Métodos e kits para a identificação de um paciente humano com uma doença inflamatória ou doença autoimune que é tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é 15 não responsivo ou refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan $^{\circledR}$), bem como métodos e kits para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem uma doença inflamatória ou doença autoimune que é não responsivo ou refratário ao tratamento com 20 rituximab (Rituxan $^{\circledR}$), também são fornecidos. Os métodos da presente invenção têm uso no tratamento de doenças inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas a células que expressam CD40. Esses métodos são particularmente vantajosos com relação a doenças 25 inflamatórias e doenças autoimunes que são associadas a células que expressam tanto CD40 quanto CD20, uma vez que os métodos permitem o tratamento de pacientes que têm doença inflamatória ou autoimunes que é não responsivo ou refratário à terapia com outros agentes terapêuticos como 30 anticorpos anti-CD20.