

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.11.04	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS INC. 4560 HORTON STREET, EMERYVILLE, CALIFORNIA 94608 US
(30) Prioridade(s): 2003.11.04 US 517337 P 2003.11.26 US 525579 P 2004.04.27 US 565710 P	(72) Inventor(es): LI LONG US MOHAMMAD LUQMAN US ASHA YABANNAVAR US ISABEL ZAROR US
(43) Data de publicação do pedido: 2006.08.30	(74) Mandatário: FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE ATAYDE AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2010.08.04 238/2010	

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E INFLAMATÓRIAS E DA REJEIÇÃO AO TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A MÉTODOS TERAPÊUTICOS PARA TRATAMENTO DE UM INDIVÍDUO COM UMA DOENÇA AUTO-IMUNE E/OU INFLAMATÓRIA. OS MÉTODOS COMPREENDEM A ADMINISTRAÇÃO DE UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE UM ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-CD40 OU DE UM SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO A UM PACIENTE QUE DELA NECESSITE. O ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-CD40 OU O SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO É ISENTO DE ACTIVIDADE AGONISTA SIGNIFICATIVA, MAS EXIBE ACTIVIDADE ANTAGONISTA QUANDO O ANTICORPO SE LIGA AO ANTIGÉNIO CD40 NUMA CÉLULA HUMANA QUE EXPRESSA O CD40. A ACTIVIDADE ANTAGONISTA DO ANTICORPO ANTI-CD40 OU DO SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO INIBE DE UMA FORMA BENÉFICA A ESTIMULAÇÃO, MEDIADA POR CD40L, DAS CÉLULAS QUE EXPRESSAM CD40, E DESTE MODO INIBE AS VIAS DE SOBREVIVÊNCIA E DE SINALIZAÇÃO, MEDIADAS POR CD40L, DAS CÉLULAS HUMANAS QUE EXPRESSAM CD40.

RESUMO

EPÍGRAFE:	<u>"UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E INFLAMATÓRIAS E DA REJEIÇÃO AO TRANSPLANTE DE ORGÃOS"</u>
-----------	---

A presente invenção refere-se a métodos terapêuticos para tratamento de um indivíduo com uma doença auto-imune e/ou inflamatória. Os métodos compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno a um paciente que dela necessite. O anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antígeno é isento de actividade agonista significativa, mas exhibe actividade antagonista quando o anticorpo se liga ao antígeno CD40 numa célula humana que expressa o CD40. A actividade antagonista do anticorpo anti-CD40 ou do seu fragmento de ligação ao antígeno inibe de uma forma benéfica a estimulação, mediada por CD40L, das células que expressam CD40, e deste modo inibe as vias de sobrevivência e de sinalização, mediadas por CD40L, das células humanas que expressam CD40.

DESCRIÇÃO

<u>EPÍGRAFE</u>	<u>"UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40</u> <u>PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E</u> <u>INFLAMATÓRIAS E DA REJEIÇÃO AO TRANSPLANTE DE</u> <u>ORGÃOS"</u>
-----------------	--

CAMPO TÉCNICO

A invenção relaciona-se com métodos para o tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias usando anticorpos monoclonais antagonistas anti-CD40.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O antígeno CD40 é um antígeno da superfície celular com 55 kDa que se encontra presente à superfície das células B normais e neoplásicas, das células dendríticas, de outras células apresentadoras de antígeno (APCs), das células endoteliais, dos monócitos, das células T CD8+ e das células epiteliais. O antígeno CD40 é igualmente expresso em células T activadas, plaquetas activadas, células do músculo liso vascular inflamadas, eosinófilos, membranas sinoviais na artrite reumatóide, fibroblastos da derme e outros tipos celulares não linfóides. Dependendo do tipo de célula que expressa CD40, a ligação pode induzir adesão intercelular, diferenciação, activação e proliferação. Por exemplo, a ligação de CD40 ao seu ligando conhecido, CD40L (também designado por CD154), estimula a proliferação das células B e a sua diferenciação até plasmócitos, a produção de anticorpos, a conversão entre isotipos e a geração de células B de

memória. Durante a diferenciação das células B, o antigénio CD40 é expresso nas células pré-B mas perde-se em consequência da diferenciação até plasmócitos.

O ligando de CD40 foi identificado na superfície celular das células T activadas (Fenslow et al. (1992) J. Immunol.149:655; Lane et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2573; Noelle et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6550), mas geralmente não é expresso pelas células T humanas em repouso. O CD40L é uma glicoproteína transmembranar de tipo II que possui homologia com o TNF- α (Armitage et al. (1992) Nature 357:80 e Spriggs et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1543). O domínio extracelular de CD40L contém dois resíduos de arginina em posição proximal relativamente à região transmembranar, proporcionando um potencial local de corte proteolítico que dá origem a uma forma solúvel do ligando (sCD40L). A sobreexpressão de CD40L causa doenças autoimunes semelhantes ao lúpus eritematoso sistémico em modelos de roedores (Higuchi et al. (2002) J. Immunol. 168:9-12). Por contraste, a ausência de CD40L funcional nas células T activadas causa o síndrome de hiper-IgM ligado ao X (Allen et al. (1993) Science 259:990; and Korthauer et al. (1993) Nature 361:539). Ainda, o bloqueio da interacção CD40/CD40L pode prevenir a rejeição de transplantes em modelos de primatas não-humanos. Ver, por exemplo, Wee et al. (1992) Transplantation 53:501-7.

A expressão de CD40 nas APCs desempenha um importante papel co-estimulador na activação destas células. Por exemplo, verificou-se que os anticorpos monoclonais (mAbs) agonistas anti-CD40 mimetizam os efeitos das células T helper sobre a activação das células B. Quando apresentados por células aderentes que expressam Fc γ RII, estes anticorpos induzem a proliferação das células B (Banchereau et al. (1989) Science 251:70). Adicionalmente, os mAbs agonistas anti-CD40 podem substituir o sinal das células T helper para a secreção de

IgM, IgG e IgE na presença de IL-4 (Gascan et al. (1991) J. Immunol. 147:8). Ainda, os mAbs agonistas anti-CD40 têm a capacidade de evitar a morte celular programada (apoptose) das células B isoladas a partir de nódulos linfáticos.

Estas e outras observações apoiam a teoria actual de que a interacção entre o antigénio CD40 e o CD40L desempenha um papel central na regulação das respostas imunes humorais e mediadas por células. Os estudos mais recentes revelaram uma participação bastante mais alargada da interacção CD40/CD40L em diversos processos fisiológicos e patológicos.

A via de transdução de sinal do CD40 depende da regulação coordenada de muitos factores intracelulares. Tal como os outros membros da família de receptores do TNF, o CD40 reage com as proteínas TRAF (Factores Associados ao Receptor do TNF) tais como TRAF2 e TRAF3, as quais medeiam um sinal intracelular na sequência da interacção do CD40 com CD40L (tanto o CD40L em fase sólida como o CD40L solúvel). As TRAFs transduzem um sinal para o núcleo através das map kinases como a NIK (kinase indutora de NF- κ B) e das I-kappa B kinases (IKK α/β), tendo como resultado final a activação do factor de transcrição NF- κ B (Young et al. (1998) Immunol. Today 19:502-06). A sinalização através de Ras e da via de MEK/ERK foi também demonstrada num subconjunto de células B. As vias adicionais envolvidas na sinalização celular por CD40 incluem a via de PI3K/Akt e a via de P38 MAPK (Craxton et al. (1998) J. Immunol. 5:439-447).

Verificou-se que a sinalização através de CD40 evita a morte celular por apoptose (Makus et al. (2002) J. Immunol. 14:973-982). Os sinais apoptóticos são necessários para induzir a morte celular programada de uma forma coordenada. Os sinais para a morte celular podem incluir estímulos intrínsecos provenientes do interior da célula, tal como o stress do retículo endoplasmático, ou estímulos extrínsecos,

tal como a ligação de FasL ou de TNF α aos receptores. A via de sinalização é complexa, envolvendo a activação de caspases, tais como as caspases 3 e 9, e da poli(ADP ribose) polimerase (PARP). Durante a cascata, as proteínas anti-apoptóticas de sinalização, tais como Mcl-1 e BCLx, e membros das proteínas da família IAP, tal como o Inibidor da Apoptose Ligado ao X (XIAP), sofrem regulação negativa (Budihardjo et al. (1999) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15:269-90). Por exemplo, nas células dendríticas, a sinalização celular por CD40 pode bloquear os sinais de apoptose transduzidos por FasL (Bjorck et al. (1997) Int'l Immunol. 9:365-372).

Deste modo, a interacção entre CD40 e CD40L e a subsequente activação da sinalização por CD40 constituem passos necessários para as respostas imunes normais; no entanto, a desregulação da sinalização por CD40 pode conduzir a estados de doença. Demonstrou-se já que a via de sinalização por CD40 está envolvida nas doenças autoimunes (Ichikawa et al. (2002) J. Immunol. 169:2781-7 e Moore et al. (2002) J. Autoimmun. 19:139-45). Adicionalmente, a interacção CD40/CD40L desempenha um importante papel nos processos inflamatórios. Por exemplo, tanto o antigénio CD40 como o ligando de CD40 são sobreexpressos nas lesões ateroscleróticas humanas e experimentais. A estimulação por CD40 induz a expressão de enzimas de degradação da matriz e a expressão de factor tecidual nos tipos celulares associados a ateroma, tais como células endoteliais, células do músculo liso e macrófagos. Adicionalmente, a estimulação por CD40 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6 e IL-8, e de moléculas de adesão tais como ICAM-1, E-selectina e VCAM. A inibição da interacção CD40/CD40L previne a aterogénese em modelos animais. Em modelos de transplante, o bloqueio da interacção CD40/CD40L previne a inflamação. Verificou-se que a ligação de CD40/CD40L actua sinergicamente com o péptido beta-

amilóide de Alzheimer para promover a activação microglial, conduzindo deste modo a neurotoxicidade.

Nos pacientes com artrite reumatóide (AR), a expressão de CD40 está aumentada nos condrócitos articulares; assim, a sinalização por CD40 contribui provavelmente para a produção de citocinas e de metaloproteínases da matriz prejudiciais. Ver Gotoh et al. (2004) J. Rheumatol. 31:1506-12. Ainda, foi já demonstrado que a amplificação da resposta inflamatória sinovial ocorre através da activação das proteína kinases activadas por mitogénio (MAP) e pelo factor nuclear kappaB (NFkB) em resultado da interacção com CD40 a nível das células sinoviais CD14+ de pacientes com AR (Harigai et al. (2004) Arthritis. Rheum. 50:2167-77). Num modelo experimental de AR, o tratamento com anticorpo anti-CD40L evitou a indução da doença, a inflamação das articulações e a produção de anticorpos anti-colagénio (Durie et al. (1993) Science 261:1328). Finalmente, em ensaios clínicos, verificou-se que a inibição das células B CD20+ positivas em pacientes com AR através da administração de RITUXAN® (geralmente indicado para o linfoma a células B) melhora os sintomas (Shaw et al. (2003) Ann. Rheum. Dis, 62:ii55-ii59).

Verificou-se igualmente que o bloqueio das interacções CD40/CD40L durante a apresentação do antigénio às células T induz a tolerância das células T. Assim, o bloqueio da interacção CD40/CD40L evita a activação inicial das células T, ao mesmo tempo que induz tolerância a longo prazo à re-exposição ao antigénio.

Tendo em conta o papel crítico da sinalização por CD40 mediada por CD40L na manutenção de uma imunidade normal, torna-se necessário desenvolver métodos que possibilitem a intervenção nesta via de sinalização quando ocorre uma desregulação.

As patentes WO 01/83755, WO 02/28480 e WO 02/28904 descrevem anticorpos com a capacidade de se ligar ao CD40, métodos para a produção desses anticorpos e métodos para o seu uso.

Ellmark et al. (Immunology 2002, 106, 456-463) refere a modulação da interacção CD40-ligando de CD40 usando fragmentos de anticorpos de cadeia única anti-CD40 humano.

BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

A invenção fornece um anticorpo monoclonal humano que tem a capacidade de se ligar de modo específico a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula que expressa o CD40 humano, estando o dito anticorpo monoclonal substancialmente isento de actividade agonista significativa, quando se liga ao antígeno CD40 expresso à superfície da dita célula, para uso num método para o tratamento de um indivíduo humano que sofre de doença inflamatória ou auto-imune, caracterizado por compreender a administração ao dito indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal anti-CD40, sendo o dito anticorpo seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;
- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12;

- c) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano exposta na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12; e
- d) Um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva.
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

A invenção proporciona igualmente o uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal humano anti-CD40, o qual tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano que é expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento de um indivíduo humano para a doença auto-imune ou inflamatória, estando o dito anticorpo isento de actividade agonista significativa, quando se liga ao antígeno CD40 expresso à superfície da dita célula, sendo o dito anticorpo monoclonal humano anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a

partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12;
- c) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano exposta na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12; e
- d) Um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

A invenção fornece igualmente um anticorpo monoclonal humano anti-CD40 que tem a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 humano, estando o dito anticorpo monoclonal substancialmente isento de actividade agonista significativa quando ligado ao antígeno CD40, expresso à superfície da dita célula para uso num método para tratar um individuo humano da rejeição ao transplante, sendo o dito método caracterizado por compreender a administração ao dito individuo uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal anti-CD40 humano, e sendo o dito anticorpo seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;
- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12;
- c) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano exposta na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12; e
- d) Um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

A invenção proporciona igualmente o uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal humano anti-CD40, o qual tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano que é expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento de um indivíduo humano contra a rejeição de um transplante, quando o dito anticorpo monoclonal se liga ao

antigénio CD40 que é expresso à superfície da dita célula, sendo o dito anticorpo monoclonal humano anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;
- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12;
- c) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano exposta na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12; e
- d) Um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antigénio CD40 humano.

A invenção fornece ainda um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar de modo específico a um antigénio CD40 humano expresso à superfície de uma célula que expressa o CD40 humano, estando o dito anticorpo

monoclonal isento de actividade agonista significativa quando se liga ao antígeno CD40 expresso à superfície da dita célula, para uso num método para o tratamento da artrite reumatóide num indivíduo humano, caracterizado por compreender a administração ao dito indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal anti-CD40 humano, sendo o dito anticorpo seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;
- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12;
- c) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano exposta na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12; e
- d) Um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

A invenção proporciona igualmente o uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal humano anti-CD40, o qual tem a capacidade de se ligar especificamente a um antigénio CD40 humano que é expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, no fabrico de um medicamento destinado ao tratamento de um indivíduo humano com artrite reumatóide, estando o dito anticorpo isento de actividade agonista significativa, e verificando-se que, quando se liga ao antigénio CD40 que é expresso à superfície da dita célula, sendo o dito anticorpo monoclonal humano anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;
- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12;
- c) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano exposta na SEQ ID NO:10 ou na SEQ ID NO:12; e
- d) Um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), em que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

Outros aspectos da invenção encontram-se expostos nas Reivindicações anexas.

BREVE SUMÁRIO DA EXPOSIÇÃO

São apresentados métodos para o tratamento duma doença auto-imune e/ou inflamatória num indivíduo humano, caracterizados por compreender a administração ao indivíduo de um anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno que é isento de actividade agonista significativa quando ligado a um antígeno CD40 numa célula humana que expressa CD40. São igualmente apresentados métodos para a inibir a resposta de células que expressam o antígeno CD40. Os anticorpos antagonistas anti-CD40 para uso na presente invenção possuem uma elevada afinidade para o CD40. Estes anticorpos monoclonais e seus fragmentos de ligação ao antígeno têm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana. Estão isentos de actividade agonista significativa mas exibem actividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 em células humanas. Em uma das formas de realização, o anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento exhibe actividade antagonista quando ligado ao antígeno CD40 em células apresentadoras de antígeno tais como as células B.

Os anticorpos antagonistas são especialmente úteis na prevenção, melhoria ou tratamento de doenças que compreendem um componente autoimune e/ou inflamatório. Estas doenças incluem, de modo não limitativo, doenças autoimunes e

inflamatórias como o lúpus eritematoso sistémico (LES), lúpus discóide, lúpus nefrítico, sarcoidose, artrite inflamatória, incluindo, de modo não limitativo, artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante e artrite gotosa, rejeição do transplante de um órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crónica e/ou doença de 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, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença por complexos imunes, síndrome de disfunção imune e fadiga crónica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinémia, trombólise, cardiomiopatia, pénfigo, fibrose pulmonar intersticial, sarcoidose, diabetes mellitus Tipo I e Tipo II, hipersensibilidade retardada dos tipos 1, 2, 3 e 4, alergias ou distúrbios alérgicos, respostas imunes não desejadas/imprevistas a proteínas terapêuticas, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite alérgica e de irritação por contacto, urticária, alergias mediadas por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer, polineuropatia inflamatória desmielinizante crónica e semelhantes.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 expõe as sequências de aminoácidos das cadeias leves e pesadas do mAc CHIR-12.12. As regiões leader (resíduos 1-20 da SEQ ID NO:2), variável (resíduos 21-132 da SEQ ID NO:2), e constante (resíduos 133-239 da SEQ ID NO:2) da cadeia

leve são apresentadas na Figura 1A. As regiões leader (resíduos 1-19 da SEQ ID NO:4), variável (resíduos 20-139 da SEQ ID NO:4), e constante (resíduos 140-469 da SEQ ID NO:4) da cadeia pesada são apresentadas na Figura 1B. A região constante alternativa para a cadeia pesada do mAc CHIR-12.12 apresentada na Figura 1B reflecte a substituição de um resíduo de alanina por um resíduo de serina na posição 153 da SEQ ID NO:4. A sequência completa para esta variante da cadeia pesada do mAc CHIR-12.12 é apresentada na SEQ ID NO:5.

A Figura 2 mostra a sequência codificante para a cadeia leve (Figura 2A; SEQ ID NO:1) e para a cadeia pesada (Figura 2B; SEQ ID NO:3) do mAc CHIR-12.12.

A Figura 3 apresenta as sequências de aminoácidos para as cadeias de aminoácidos leve e pesada do mAc CHIR-5.9. As regiões leader (resíduos 1-20 da SEQ ID NO:6), variável (resíduos 21-132 da SEQ ID NO:6), e constante (resíduos 133-239 da SEQ ID NO:6) da cadeia leve são apresentadas na Figura 3A. As regiões leader (resíduos 1-19 da SEQ ID NO:7), variável (resíduos 20-144 da SEQ ID NO:7), e constante (resíduos 145-474 da SEQ ID NO:7) da cadeia pesada são apresentadas na Figura 3B. A região constante alternativa para a cadeia pesada do mAc CHIR-5.9 apresentada na Figura 3B reflecte a substituição de um resíduo de alanina por um resíduo de serina na posição 158 da SEQ ID NO:7. A sequência completa para esta variante da cadeia pesada do mAc CHIR-5.9 é apresentada na SEQ ID NO:8.

A Figura 4 mostra a sequência codificante (Figura 4A; SEQ ID NO:9) para a isoforma curta do CD40 humano (sequência de aminoácidos apresentada na Figura 4B; SEQ ID NO:10), e a sequência codificante (Figura 4C; SEQ ID NO:11) para a isoforma longa do CD40 humano (sequência de aminoácidos apresentada na Figura 4D). A Figura 5 mostra a temperatura de

fusão térmica do CHIR-12.12 em diferentes formulações de pH, medida por calorimetria diferencial de varrimento (DSC).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos para tratamento de doenças inflamatórias e auto-imunes utilizando anticorpos com forte afinidade para o antígeno de superfície celular CD40. Estes anticorpos anti-CD40 e os seus fragmentos de ligação ao antígeno são isentos de actividade agonista significativa e exibem actividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 em células que expressam CD40.

"Anticorpos" e "imunoglobulinas" (Igs) são glicoproteínas que possuem as mesmas características estruturais. Enquanto que os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antígeno, as imunoglobulinas incluem tanto os anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos que não possuem especificidade antigénica. Os polipéptidos deste último tipo são, por exemplo, produzidos em baixos níveis pelo sistema linfóide e em níveis aumentados pelos mielomas.

O termo "anticorpo" é usado no sentido mais lato e abrange anticorpos de estrutura completa, fragmentos de anticorpos que se podem ligar ao antígeno (p.ex., Fab', F'(Ab)₂, Fv, anticorpos de cadeia única, diacorpos), e péptidos recombinantes compreendendo os aqui referidos.

O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui é usado, refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, i.e., os anticorpos individuais que formam a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que estejam presentes em quantidades diminutas.

Os "anticorpos nativos" e as "imunoglobulinas nativas" são geralmente glicoproteínas heterotetraméricas com cerca de 150.000 daltons, compostas por duas cadeias leves (L)

idênticas e por duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada através de uma ligação dissulfito covalente, enquanto que entre as cadeias pesadas o número de ligações dissulfito varia segundo os diferentes isotipos de imunoglobulinas. Cada cadeia leve e pesada possui ainda pontes dissulfito intra-cadeia a espaços regulares. Cada cadeia pesada possui numa extremidade um domínio variável (V_H) seguido por diversos domínios constantes. Cada cadeia leve possui um domínio variável (V_L) numa extremidade e um domínio constante na sua 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 alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Crê-se que certos resíduos particulares de aminoácidos formem uma interface entre os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas.

O termo "variável" refere-se ao facto de que certas porções dos domínios variáveis diferem extensamente quanto à sequência entre os diversos anticorpos e estão envolvidas na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu antigénio particular. No entanto, a variabilidade não se encontra distribuída de modo uniforme ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos, mas sim concentrada em três segmentos designados por regiões determinantes da complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis que existem nos domínios variáveis tanto das cadeias leves como das cadeias pesadas. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são designadas por regiões de "framework" (FR). Cada um dos domínios variáveis das cadeias pesadas e leves nativas compreende quatro regiões FR, as quais se encontram principalmente numa configuração em folha β , ligadas por três CDRs, as quais formam "loops" que ligam, e em alguns casos integram, a estrutura em folha β . As CDRs em cada cadeia

são mantidas em estreita proximidade por meio das regiões FR e, juntamente com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação ao antígeno nos anticorpos (ver Kabat et al. (1991) NIH Publ. No. 91-3242, Vol. 1, págs. 647-669).

Os domínios constantes não se encontram directamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem diversas funções efectoras, tais como a ligação ao receptor de Fc (FcR), a participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpos, a opsonização, a iniciação da citotoxicidade dependente do complemento e a desgranulação dos mastócitos.

O termo "região hipervariável", tal como aqui é usado, refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante da complementaridade" ou "CDR" (i.e., os resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Kabat et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest (5^a Ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD) e/ou os resíduos de um "loop hipervariável" (i.e., os resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Clothia e Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196:901-917).

Os resíduos "de framework" ou "FR" são os resíduos do domínio variável que não fazem parte dos resíduos da região hipervariável.

Os "fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferencialmente a região de ligação ao antígeno ou a região variável do anticorpo intacto. Os

exemplos de fragmentos de anticorpos incluem os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpos. A digestão dos anticorpos pela papaína produz dois fragmentos idênticos de ligação ao antígeno, designados por fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao antígeno, e um fragmento residual "Fc", cujo nome reflecte a sua capacidade para cristalizar com facilidade. O tratamento com pepsina fornece um fragmento F(ab')₂ que possui dois locais de combinação com o antígeno e tem a capacidade de estabelecer duas ligações com os antígenos.

"Fv" corresponde ao mínimo fragmento de anticorpo que contém um local completo de reconhecimento e ligação ao antígeno. Num elemento Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um domínio variável de cadeia leve em estreita associação não covalente. Num elemento Fv de cadeia única, um domínio variável de cadeia pesada e outro de cadeia leve podem estar covalentemente ligados por um linker peptídico flexível de modo a que as cadeias pesada e leve se possam associar numa estrutura "dimérica" análoga à de um elemento Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação ao antígeno à superfície do dímero V_H-V_L. Colectivamente, as seis CDRs conferem ao anticorpo a especificidade de ligação ao antígeno. No entanto, mesmo um só domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicos para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e de se ligar a um antígeno, se bem que com uma afinidade mais baixa do que a do local de ligação completo.

O fragmento Fab contém igualmente o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem dos fragmentos Fab' pela adição de alguns resíduos à extremidade carboxílica do domínio de cadeia pesada C_{H1} , incluindo uma ou mais cisteínas da região de "dobradiça" do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui dada a um Fab' no qual o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes integra(m) um grupo tiol livre. Os fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' possuindo cisteínas de "dobradiça" entre ambos. São ainda conhecidas outras associações químicas entre fragmentos de anticorpos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie de vertebrado podem pertencer a um de dois tipos claramente distintos, designados por kappa (κ) e lambda (λ) segundo as sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

As imunoglobulinas dividem-se em classes diferentes consoante a sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e algumas destas podem ainda subdividir-se em subclasses (isotipos), p.ex., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são designados por alfa, delta, épsilon, gama e mu, respectivamente. As estruturas das subunidades e a configuração tridimensional das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Os diferentes isotipos possuem diferentes funções efectoras. Por exemplo, os isotipos humanos IgG1 e IgG3 medeiam a actividade citotóxica mediada por células e dependente de anticorpo (ADCC).

O termo "marcador", tal como aqui é usado, refere-se a um composto ou composição detectável que é conjugado directamente

ou indirectamente com o anticorpo para gerar um anticorpo "marcado". O marcador poderá ser detectável por si só (p.ex., marcadores radioisotópicos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, poderá catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável.

O termo "antagonista" é usado no seu sentido mais lato e inclui qualquer molécula que bloqueia parcialmente ou completamente, inibe ou neutraliza uma actividade biológica de um alvo nativo aqui exposto, ou a transcrição ou tradução deste.

A designação "veículos", tal como aqui é usada, inclui veículos farmaceuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizadores que não são tóxicos para a célula ou mamífero que a estes é exposto às dosagens e concentrações utilizadas. Frequentemente o veículo fisiologicamente aceitável corresponde a uma solução aquosa de pH tamponado. Os exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato, succinato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipéptidos de baixo peso molecular (com menos de 10 resíduos); proteínas, tal como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como a polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monosacáridos, disacáridos e outros hidratos de carbono, incluindo glucose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como o EDTA; açúcares alcoólicos tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formadores de sais tais como o sódio; e/ou surfactantes não iónicos tais como Tween, polietilenoglicol (PEG) e plurónicos. A administração "em combinação com" um ou mais agentes terapêuticos adicionais inclui a administração simultânea (em conjunto) e a administração consecutiva em qualquer ordem.

O termo "célula hospedeira", tal como aqui é usado, refere-se a um microorganismo ou a uma célula ou linha celular eucariótica cultivada como entidade unicelular que poderá ser, ou foi, usada como receptor para um vector recombinante ou para outros polinucleótidos de transferência, e inclui a descendência da célula original que foi transfectada. Deve entender-se que a descendência de uma única célula poderá não ser necessariamente idêntica por completo, em morfologia ou em DNA genómico ou total, à célula progenitora original, devido aos fenómenos de mutação natural, accidental ou deliberada.

As "células efectoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e que realizam funções efectoras. Preferencialmente, as células expressam pelo menos Fc γ RIII e desempenham a função efectora de citotoxicidade mediada por células e dependente do antigénio (ADCC). Os exemplos de leucócitos humanos que funcionam como mediadores na ADCC incluem as células mononucleares do sangue periférico (CMSP), células natural killer (NK), monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, sendo preferidas as CMSP e as células NK. Os anticorpos com actividade ADCC são tipicamente dos isotipos IgG1 ou IgG3. De notar que, para além de isolar anticorpos IgG1 e IgG3, poderão produzir-se anticorpos mediadores da ADCC construindo-os a partir de uma região variável de um anticorpo não-ADCC, ou de um fragmento da região variável, e de uma região constante do isotipo IgG1 ou IgG3.

Os termos "receptor de 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 sequência nativa. Ademais, um FcR preferido será aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama), estando incluídos receptores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII e também as variantes alélicas e as formas de splicing alternativo destes

receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor activador") e FcγRIIB (um "receptor inibidor"), os quais têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O receptor activador FcγRIIA contém um motivo de activação do imunoreceptor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor inibidor FcγRIIB contém um motivo de inibição do imunoreceptor baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático (ver Dairon (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234). Os FcRs são expostos em Ravetch e Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel et al. (1994) *Immunomethods* 4:25-34; e de Haas et al. (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341. Outros FcRs, incluindo os que serão identificados no futuro, são abrangidos pelo termo "FcR" aqui citado. O termo inclui igualmente o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al. (1976) *J. Immunol.* 117:587 e Kim et al. (1994) *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Existem diversas vias para fabricar anticorpos humanos. Por exemplo, as células secretoras poderão ser imortalizadas por infecção pelo vírus de Epstein-Barr (EBV). No entanto, as células infectadas pelo EBV são difíceis de clonar e geralmente produzem rendimentos relativamente baixos de imunoglobulinas (James e Bell (1987) *J. Immunol. Methods* 100:5-40). No futuro, a imortalização de células B humanas poderá vir a ser atingida através da introdução de uma combinação definida de genes transformantes. Esta possibilidade é evidenciada por uma demonstração recente de que a expressão da subunidade catalítica da telomerase, juntamente com a grande oncoproteína de SV40 e com um alelo oncogénico de H-ras, resultou na conversão tumorigénica de células epiteliais e de fibroblastos humanos normais (Hahn et

al. (1999) Nature 400:464-468). É presentemente possível produzir animais transgênicos (p.ex., ratinhos) que têm a capacidade de, após imunização, produzir diversos anticorpos humanos na ausência de produção endógena de imunoglobulinas (Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Lonberg e Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Methods 231:11-23; Tomikuza et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727; revisto em Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370). Por exemplo, tem sido descrito que a deleção homozigótica do gene codificando para a região de junção da cadeia pesada dos anticorpos (J_H) em ratinhos mutantes quiméricos e de linha germinal resulta numa inibição completa da produção endógena de anticorpos (Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555). A transferência do conjunto de genes de imunoglobulinas da linha germinal humana para estes ratinhos mutantes de linha germinal resulta na produção de anticorpos humanos após estimulação com antígeno (Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258). Mendez et al. (1997) (Nature Genetics 15:146-156) criaram uma linha de ratinhos transgênicos que, quando estimulados por um antígeno, geram anticorpos inteiramente humanos de alta afinidade. Tal foi atingido por integração, na linha germinal, de locus de cadeias pesadas e de cadeias leves de uma megabase humana em ratinhos com deleção no segmento endógeno J_H , tal como acima descrito. Estes ratinhos (tecnologia Xenomouse® II (Abgenix; Fremont, California)) são portadores de 1.020 kb de locus de cadeias pesadas humanas contendo aproximadamente 66 genes V_H , regiões D_H e J_H completas, e três regiões constantes diferentes, sendo ainda portadores de 800 kb de um locus κ humano contendo 32 genes V_κ , segmentos J_κ e genes C_κ . Os anticorpos produzidos nesses ratinhos assemelham-se de perto

aos encontrados nos seres humanos em todos os aspectos, incluindo o rearranjo de genes, a associação de cadeias e o repertório. Os anticorpos humanos são expressos preferencialmente aos anticorpos endógenos devido à deleção do segmento endógeno que inviabiliza o rearranjo de genes no locus murino. Tais ratinhos poderão ser imunizados com um antígeno de interesse particular.

Os soros de tais animais imunizados podem ser rastreados quanto à reactividade dos anticorpos contra o antígeno inicial. Os linfócitos podem ser isolados a partir de nódulos linfáticos ou de esplenócitos e podem ainda ser seleccionadas as células B por meio da selecção de células CD138-negativas e CD19-positivas. Em um dos aspectos, tais culturas de células B (CCBs) podem ser fundidas a células de mieloma para gerar hibridomas, tal como particularizado acima.

Em outro aspecto, tais culturas de células B podem ser ainda analisadas quanto à reactividade contra o antígeno inicial, de preferência. Tal análise inclui ELISA com o alvo/proteína antigénica, um ensaio de competição com anticorpos conhecidos que se ligam ao antígeno de interesse, e a ligação in vitro a células CHO ou outras transitoriamente transfectadas que expressam o antígeno alvo.

A presente invenção relaciona-se com composições e métodos para o tratamento de indivíduos humanos com doença autoimune e/ou doença inflamatória. Os métodos envolvem o tratamento com um anticorpo anti-CD40 aqui descrito, ou com um seu fragmento de ligação ao antígeno, sendo que a administração do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno promove uma resposta terapêutica positiva no indivíduo que é submetido a este método terapêutico. Os métodos e composições são especialmente úteis no tratamento de doenças que incluem, de modo não limitativo, doenças auto-imunes tais como: lúpus eritematoso sistémico (LES), lúpus discóide, lúpus nefrítico,

sarcoidose, artrite inflamatória, incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante e artrite gotosa, rejeição de um transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crónica e/ou doença de 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, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença por complexos imunes, síndrome de disfunção imune e fadiga crónica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinémia, trombólise, cardiomiopatia, pénfigo vulgaris, fibrose pulmonar intersticial, diabetes mellitus Tipo I e Tipo II e semelhantes. Adicionalmente estes anticorpos antogonistas anti-CD40 e os seus fragmento de ligação ao antigénio são especialmente úteis no tratamento de doenças associadas a inflamação, incluindo, de modo não limitativo, hipersensibilidade retardada dos tipos 1, 2, 3 e 4, alergias ou distúrbios alérgicos, respostas imunes indesejadas/inesperadas a proteínas terapêuticas (ver, por exemplo, o Pedido de Patente dos EUA No. US 2002/0119151 e Koren et al. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60), asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite alérgica e de irritação por contacto, urticária, alergias mediadas por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer, polineuropatia inflamatória desmielinizante crónica e semelhantes.

Os anticorpos anti-CD40 adequados para uso com os métodos da invenção ligam-se especificamente a um antigénio CD40

humano expresso à superfície de uma célula humana e são isentos de actividade agonista significativa, mas exibem actividade antagonista quando ligados ao antigénio CD40 de uma célula humana que expressa o CD40 humano. Estes anticorpos anti-CD40 e seus fragmentos de ligação ao antigénio são referidos como anticorpos antagonistas anti-CD40. Tais anticorpos incluem, de modo não limitativo, os anticorpos monoclonais inteiramente humanos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 abaixo descritos e os anticorpos monoclonais que possuem as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Estes anticorpos monoclonais, que podem ser produzidos por via recombinante, são abaixo descritos.

Os anticorpos que possuem as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 incluem os anticorpos que interferem competitivamente com a ligação ao CD40 e/ou que se ligam aos mesmos epitopos a que se ligam CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Um perito na técnica poderá determinar, recorrendo a métodos padronizados, se um dado anticorpo interfere competitivamente com CHIR-5.9 ou CHIR-12.12.

Quando estes anticorpos se ligam ao CD40 exposto à superfície de células humanas, tais como células B humanas, células T, células dendríticas, células endoteliais, plaquetas activadas, células do músculo liso vascular inflamadas, eosinófilos, membranas sinoviais, fibroblastos dérmicos, e semelhantes, os anticorpos são isentos de actividade agonista significativa; em algumas formas de realização, a sua ligação ao CD40 exposto à superfície das células humanas resulta na inibição da activação e diferenciação dessas células humanas. Assim, os anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados para uso com os métodos da invenção incluem os anticorpos monoclonais que têm a capacidade de exibir actividade antagonista face a células humanas normais e anormais que expressam o antigénio de superfície celular CD40.

Anticorpos Antagonistas Anti-CD40

Os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 representam anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados para uso na presente invenção. Os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 são anticorpos monoclonais anti-CD40 inteiramente humanos do isotipo IgG₁ produzidos pelas linhas celulares de hibridoma 131.2F8.5.9 (aqui referida como linha celular 5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (aqui referida como linha celular 12.12). Estas linhas celulares foram criadas usando esplenócitos de ratinhos xenotípicos imunizados contendo o locus da cadeia pesada de IgG₁ humana e o locus da cadeia κ humana (tecnologia Xenomouse®; Abgenix; Fremont, California). Os esplenócitos foram fundidos com as células SP2/0 de mieloma de ratinho (Sierra BioSource). Os hibridomas resultantes foram sub-clonados por diversas vezes para criar as linhas celulares monoclonais estáveis 5.9 e 12.12. Os outros anticorpos da invenção podem ser preparados de modo similar usando ratinhos transgênicos para os locus de imunoglobulinas humanas ou por outros métodos conhecidos da técnica e/ou aqui descritos.

As sequências de aminoácidos das regiões leader, variável e constante da cadeia leve e da cadeia pesada do mAc CHIR-12.12 são expostas nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. Ver igualmente a SEQ ID NO:2 (sequência completa da cadeia leve do mAc CHIR-12.12), SEQ ID NO:4 (sequência completa da cadeia pesada do mAc CHIR-12.12), e SEQ ID NO:5 (sequência completa de uma variante da cadeia pesada do mAc CHIR-12.12 apresentada na SEQ ID NO:4, sendo que a variante compreende uma substituição, por serina, do resíduo de alanina na posição 153 da SEQ ID NO:4). As sequências nucleotídicas codificando para a cadeia leve e para a cadeia pesada do mAc CHIR-12.12 são expostas nas Figuras 2A e 2B, respectivamente. Ver igualmente a SEQ ID NO:1 (sequência codificante para a cadeia leve do mAc CHIR-12.12) e a SEQ ID NO:3 (sequência codificante para a

cadeia pesada do mAc CHIR-12.12). As sequências de aminoácidos das regiões leader, variável e constante da cadeia leve e da cadeia pesada do mAc CHIR-5.9 são expostas nas Figuras 3A e 3B, respectivamente. Ver igualmente a SEQ ID NO:6 (sequência completa da cadeia leve do mAc CHIR-5.9), SEQ ID NO:7 (sequência completa da cadeia pesada do mAc CHIR-5.9), e SEQ ID NO:8 (sequência completa de uma variante da cadeia pesada do mAc CHIR-5.9 apresentada na SEQ ID NO:7, sendo que a variante compreende uma substituição, por serina, do resíduo de alanina na posição 158 da SEQ ID NO:7). Adicionalmente, os hibridomas que expressam anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 foram depositados na ATCC com as designações de depósito patenteado PTA-5542 e PTA-5543, respectivamente.

Os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 ligam-se ao CD40 solúvel em ensaios de tipo ELISA, evitam a ligação do ligando de CD40 ao CD40 da superfície celular e deslocam o ligando de CD40 pré-ligado, tal como determinado por ensaios de citometria de fluxo. Os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 competem um com o outro para a ligação ao CD40 mas não com o 15B8, o anticorpo monoclonal anti-CD40 descrito na patente WO 02/28904.

Quando testados *in vitro* relativamente aos efeitos sobre a proliferação de células B de indivíduos humanos normais, CHIR-5.9 e CHIR-12.12 agem como anticorpos antagonistas anti-CD40. Adicionalmente, CHIR-5.9 e CHIR-12.12 não induzem uma forte proliferação dos linfócitos humanos dos indivíduos normais. A afinidade de ligação de CHIR-5.9 para o CD40 humano é de $1,2 \times 10^{-8}$ M e afinidade de ligação de CHIR-12.12 é de 5×10^{-10} M, tal como determinado pelo ensaio Biacore™.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados para uso com os métodos da presente invenção exibem uma forte afinidade de ligação a local único para o antigénio da superfície celular CD40. Os anticorpos monoclonais da invenção exibem uma

constante de equilíbrio de dissociação (K_D) para o CD40 de pelo menos 10^{-5} M, pelo menos 3×10^{-5} M, preferencialmente pelo menos 10^{-6} M a 10^{-7} M, mais preferencialmente pelo menos 10^{-8} a 10^{-12} M, tal como medido usando um ensaio padronizado como o Biacore™. A análise Biacore é bem conhecida neste campo técnico e os seus detalhes são expostos no "BIAapplications Handbook". Os métodos descritos na WO 01/27160 podem ser usados para modular a afinidade de ligação.

Por "antigénio CD40", "antigénio de superfície celular CD40", "receptor CD40" ou "CD40" pretende-se designar uma glicoproteína transmembranar que pertence à família de receptores do factor de necrose tumoral (TNF) (ver, por exemplo, as patentes dos EUA nos. 5.674.492 e 4.708.871; Stamenkovic et al. (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay et al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2ª Ed.; Academic Press, San Diego)). Foram já identificadas duas isoformas do CD40 humano, codificadas por variantes de transcrição por splicing alternativo deste gene. A primeira isoforma (também conhecida por "a isoforma longa" ou "isoforma 1") é expressa sob a forma de um polipéptido precursor de 277 aminoácidos (SEQ ID NO:12 (reportada pela primeira vez com o N° de Acesso Genbank CAA43045, e identificada como isoforma 1 com o N° de Acesso Genbank NP_001241), codificado pela SEQ ID NO:11 (ver os Nos. de Acesso Genbank X60592 e NM_001250)), a qual tem uma sequência de sinal representada pelos primeiros 19 resíduos. A segunda isoforma (também conhecida por "isoforma curta" ou "isoforma 2") é expressa sob a forma de um polipéptido precursor de 203 aminoácidos (SEQ ID NO:10 (N° de Acesso Genbank NP_690593), codificado pela SEQ ID NO:9 (N° de Acesso Genbank NM_152854)), que possui igualmente uma sequência de sinal representada pelos primeiros 19 resíduos. Os polipéptidos precursores destas duas isoformas do CD40 humano têm em comum os seus

primeiros 165 resíduos (i.e., resíduos 1-165 da SEQ ID NO:10 e da SEQ ID NO:12). O polipéptido precursor da isoforma curta (mostrada na SEQ ID NO:10) é codificado por uma variante de transcrição (SEQ ID NO:9) ao qual falta um segmento codificante, o que conduz a uma alteração do molde de leitura (frameshifting); a isoforma de CD40 resultante contém uma forma diferente, mais curta, da extremidade C (resíduos 166-203 da SEQ ID NO:10) relativamente à contida na isoforma longa da CD40 (extremidade C mostrada nos resíduos 166-277 da SEQ ID NO:12). Para os fins da presente invenção, os termos "antigénio CD40", "antigénio de superfície celular CD40", "receptor CD40" ou "CD40" abrangem ambas as formas, curta e longa, do CD40. Os anticorpos anti-CD40 da presente invenção ligam-se a um epitopo do CD40 humano que reside no mesmo local tanto na isoforma curta como na isoforma longa deste antigénio de superfície celular, tal como abaixo se faz notar.

O antigénio CD40 é apresentado à superfície de uma variedade de tipos celulares, tal como se descreve em outro local desta exposição. Por "apresentado à superfície" e "expresso à superfície" pretende-se significar que o todo ou parte do antigénio CD40 se encontra exposto no exterior da célula. O antigénio CD40 apresentado ou expresso poderá estar parcialmente ou inteiramente glicosilado.

Por "actividade agonista" pretende-se indicar que a substância funciona como um agonista. Um agonista combina-se com um receptor numa célula e inicia uma reacção ou actividade que é similar ou idêntica à iniciada pelo ligando natural do receptor. Por exemplo, um agonista de CD40 induz qualquer uma, ou todas, das respostas que se seguem, indicadas de modo não limitativo: proliferação e diferenciação de células, regulação positiva de adesão intercelular através de moléculas tais como ICAM-1, E-selectina e VCAM, e semelhantes; secreção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12,

TNF, e semelhantes. Sinal de transducção através do receptor CD40 por vias tais como TRAF (por exemplo, TRAF2 e/ou TRAF3), MAP kinases como a NIK (kinase indutora de NF- κ B), as I-kappa B kinases (IKK α/β), o factor de transcrição NF- κ B, Ras e a via de MEK/ERK, a via de PI3K/Akt e a via de P38 MAPK, e semelhantes; transducção de um sinal anti-apoptótico por moléculas tais como XIAP, Mcl-1, BCLx, e semelhantes; geração de células B e/ou T de memória; produção de anticorpos de células B, mudança de isotipo de células B, regulação positiva da expressão à superfície celular de moléculas de Classe II do MFiC e de CD80/86, e semelhantes. Por "actividade antagonista" pretende-se indicar que a substância funciona como um antagonista. Por exemplo, um antagonista de CD40 evita ou reduz a indução de qualquer das respostas induzidas pela ligação do receptor CD40 a um ligando agonista, particularmente o CD40L. O antagonista pode reduzir a indução de qualquer uma ou de mais do que uma das respostas à ligação de um agonista em 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferencialmente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mais preferencialmente 70%, 80%, 85%, e ainda mais preferencialmente 90%, 95%, 99% ou 100%. Os métodos para a medição da especificidade de ligação do anticorpo anti-CD40 e do ligando de CD40 e da actividade antagonista são conhecidos dos peritos na técnica e incluem, de forma não limitativa, ensaios de ligação competitiva padronizados, ensaios para a monitorização da secreção de imunoglobulinas pelas células B, ensaios de proliferação de células B, ensaios de proliferação de células B de tipo Banchereau, ensaios de células T helper para produção de anticorpos, ensaios de co-estimulação da proliferação de células B e ensaios de regulação positiva dos marcadores de activação das células B.

Por actividade agonista "significativa" pretende-se referir uma actividade agonista pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%,

50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 100% superior à actividade agonista que é induzida por uma substância neutra ou por um controlo negativo, tal como medido por um bioensaio de resposta das células B. Preferencialmente, uma actividade agonista "significativa" corresponde a uma actividade agonista que é pelo menos 2 vezes superior ou pelo menos 3 vezes superior à actividade agonista induzida por uma substância neutra ou por um controlo negativo, tal como medido por um bioensaio tal como um ensaio de resposta das células B. Assim, por exemplo, quando a resposta das células B pretendida é a proliferação de células B, uma actividade agonista "significativa" seria a indução de um nível de proliferação de células B pelo menos 2 vezes superior ou pelo menos 3 vezes superior ao nível de proliferação de células B que é induzido por uma substância neutra ou um controlo negativo. Em uma das formas de realização, uma imunoglobulina não específica, por exemplo IgG1, que não se liga ao CD40 serve como controlo negativo. Uma substância "isenta de actividade agonista significativa" exhibe uma actividade agonista que não supera em mais do que cerca de 25% a actividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controlo negativo, preferencialmente não superando em mais do que cerca de 20%, em mais que 15%, em mais que 10%, em mais que 5%, em mais que 1%, em mais que 0,5%, ou até em mais do que 0,1% a actividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controlo negativo, tal como medido por um bioensaio tal como um ensaio de resposta de células B. Os anticorpos antagonistas anti-CD40 úteis em associação aos métodos desta invenção são isentos de actividade agonista significativa, tal como acima indicado, quando ligados a um antigénio CD40 numa célula humana. Em uma das formas de realização desta invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40 é isento de actividade agonista significativa numa resposta celular. Em outra forma de

realização da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40 é isento de actividade agonista significativa em ensaios de mais do que uma resposta celular (p.ex., proliferação e diferenciação, ou proliferação, diferenciação e relativamente às células B, produção de anticorpos).

Tal como aqui é usado, o termo "anticorpo anti-CD40" abrange qualquer anticorpo que reconheça especificamente o antígeno CD40, incluindo anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia única, e fragmentos destes tais como Fab, F(ab')₂, F_v e outros fragmentos que retêm a função de ligação ao antígeno do anticorpo anti-CD40 progenitor. De particular interesse para esta invenção são os anticorpos antagonistas anti-CD40 que partilham as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 acima descritos.

Assim, além dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR 12.12, outros anticorpos que serão úteis na prática da invenção aqui descrita incluem, mas de modo não limitativo, os seguintes: (1) os anticorpos monoclonais produzidos pelas linhas celulares de hibridoma designadas como 131.2F8.5.9 (aqui referida como linha celular 5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (aqui referida como linha celular 12.12), depositadas na ATCC como Depósito Patenteado n° PTA-5542 e Depósito Patenteado n° PTA-5543, respectivamente; (2) um anticorpo monoclonal compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste na sequência mostrada em SEQ ID NO:2; a sequência mostrada em SEQ ID NO:4; a sequência mostrada em SEQ ID NO:5; ambas as sequências mostradas em SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4, e ambas as sequências mostradas em SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:5; (3) um anticorpo monoclonal compreendendo uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste na sequência mostrada em SEQ ID NO:6, a sequência mostrada em SEQ ID NO:7, a sequência

mostrada em SEQ ID NO:8, ambas as sequências mostradas em SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7, e ambas as sequências mostradas em SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:8; (4) um anticorpo monoclonal possuindo uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos selecionada a partir do grupo que consiste na sequência de nucleótidos mostrada em SEQ ID NO:1, a sequência de nucleótidos mostrada em SEQ ID NO:3, e ambas as sequências mostradas em SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:3; (5) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítipo que tem a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma 5.9 ou pela linha celular de hibridoma 12.12; (6) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítipo que compreende os resíduos 82-87 da sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:10 ou em SEQ ID NO:12; (7) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 num ensaio de ligação competitiva; e (8) um anticorpo monoclonal que consiste num fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou dos anticorpos monoclonais referidos nos pontos (1)-(7) anteriores, sendo que o fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 humano. Os peritos na técnica reconhecerão que os anticorpos antagonistas anti-CD40, e seus fragmentos de ligação ao antígeno desses anticorpos, adequados para uso os métodos aqui descritos incluem anticorpos antagonistas anti-CD40 e fragmentos de ligação ao antígeno que são produzidos por via recombinante usando métodos bem conhecidos neste campo técnico e que abaixo se descrevem, incluindo, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 produzidos por via recombinante.

Produção de Anticorpos Antagonistas Anti-CD40

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 que se destinam a uso nesta invenção podem ser produzidos usando qualquer método conhecido dos peritos na técnica. Assim, podem ser preparados soros policlonais recorrendo a métodos convencionais. Em geral, uma solução contendo o antigénio CD40 é inicialmente usada para imunizar um animal adequado, de preferência um ratinho, rato, coelho ou cabra. Os coelhos ou as cabras são preferidos para a preparação de soros policlonais devido ao volume de soro que é possível obter e à facilidade de acesso a anticorpos marcados anti-coelho e anti-cabra.

Os soros policlonais podem ser preparados num animal transgénico, preferencialmente um ratinho portador de locus de imunoglobulinas humanas. Numa forma de realização preferida, são usadas como imunogénio células Sf9 que expressam CD40. A imunização pode também ser realizada misturando ou emulsificando a solução que contém o antigénio em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante como o adjuvante completo de Freund, e injectando a mistura ou emulsão parentericamente (em geral subcutaneamente ou intramuscularmente). Uma dose de 50-200 µg/injecção é tipicamente suficiente. A imunização é geralmente reforçada 2-6 semanas mais tarde com uma ou mais injecções da proteína em soro fisiológico, preferencialmente usando adjuvante incompleto de Freund. Alternativamente, podem gerar-se anticorpos por imunização *in vitro* usando métodos conhecidos neste campo, procedimento que, para os fins da presente invenção, é considerado como equivalente à imunização *in vivo*. Os soros policlonais são obtidos sangrando o animal imunizado para um contentor de plástico ou vidro, incubando o sangue a 25°C durante uma hora e, por fim, incubando-o a 4°C durante 2-18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (p.ex., a 1000

x g durante 10 minutos). Podem obter-se cerca de 20-50 ml por colheita a partir de coelhos.

A produção das células Sf9 (de *Spodoptera frugiperda*) é descrita na Patente dos EUA N°.6.004.552. Abreviadamente, as sequências codificando para o CD40 humano foram recombinadas num baculovírus usando vectores de transferência. Os plasmídeos foram co-transfectados com DNA de baculovírus de tipo selvagem em células Sf9. As células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante foram identificadas e purificadas por clonagem.

De preferência, o anticorpo será de natureza monoclonal. Por "anticorpo monoclonal" pretende-se designar um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, i.e., os anticorpos individuais que formam a população são idênticos excepto no que concerne a possíveis mutações de ocorrência natural que possam estar presentes em quantidades diminutas. O termo não é limitado por factores como a espécie ou a fonte do anticorpo. O termo abrange imunoglobulinas inteiras assim como fragmentos, como Fab, F(ab')₂, Fv e outros, que retêm a função de ligação ao antígeno do anticorpo. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um só local antigénico, i.e., o antígeno de superfície celular CD40 da presente invenção. Adicionalmente, em contraste com o que acontece com as preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um só determinante no antígeno. O termo "monoclonal" indica que o anticorpo foi obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo através de qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a usar de

acordo com a presente invenção poderão ser produzidos por recurso ao método de hibridomas inicialmente descrito por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, ou utilizando métodos de DNA recombinante (ver, p.ex., a Patente dos EUA N° 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas fágicas de anticorpos usando as técnicas descritas em, por exemplo, Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Marks et al. (1991) J Mol. Biol. 222:581-597; e Patente dos EUA n° 5.514.548.

Por "epitopo" pretende-se indicar a parte de uma molécula antigénica contra a qual é produzido um anticorpo e à qual o anticorpo se ligará. Os epitopos poderão compreender resíduos de aminoácidos lineares (i.e., os resíduos do epitopo estão dispostos sequencialmente um após o outro num arranjo linear), resíduos de aminoácidos não lineares (aqui referidos como "epitopos não lineares"; estes epitopos não estão dispostos sequencialmente), ou ainda compreender tanto resíduos de aminoácidos lineares como resíduos não lineares.

O termo "epitopo do antígeno CD40", tal como aqui é usado, refere-se a uma estrutura molecular (quer linear ou conformacional) que tem a capacidade de exibir imunoreactividade com os anticorpos monoclonais anti-CD40 desta invenção, excluindo o próprio antígeno CD40. Os epitopos do antígeno CD40 poderão compreender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos e outras moléculas, mas para os fins da presente invenção serão mais comumente proteínas, oligopéptidos curtos, emuladores de oligopéptidos (i.e., compostos orgânicos que emulam as propriedades de ligação ao anticorpo do antígeno CD40), ou combinações destes. Os emuladores de oligopéptidos adequados são descritos, inter alia, no pedido de patente PCT US 91/04282.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados usando o método de Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496, ou uma modificação deste. Tipicamente, um ratinho é imunizado com uma solução contendo um antigénio. A imunização pode ser realizada misturando ou emulsificando a solução que contém o antigénio em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante tal como o adjuvante completo de Freund, e injectando a mistura ou emulsão parentericamente. Qualquer dos métodos de imunização conhecido da técnica poderá ser usado para obter os anticorpos monoclonais da invenção. Após a imunização do animal, o baço (e, opcionalmente, diversos gânglios linfáticos grandes) são removidos e dissociados em células isoladas. Os esplenócitos podem ser rastreados aplicando uma suspensão de células a uma placa ou poço revestido com o antigénio de interesse. As células B que expressam imunoglobulinas ligadas à membrana específicas para o antigénio ligam-se à placa e não são eliminadas pela lavagem. As células B resultantes, ou todas as células do baço dissociadas, são então induzidas a fundir-se com as células de mieloma para formar hibridomas e são cultivadas num meio selectivo. As células resultantes são plaqueadas por diluição em série e são ensaiadas quanto à produção de anticorpos que se liguem especificamente ao antigénio de interesse (e que não se liguem a antigénios não relacionados). Os hibridomas secretores do anticorpo monoclonal (mAc) seleccionado são então cultivados *in vitro* (p.ex., em frascos de cultura celular ou em reactores de fibras ocas), ou *in vivo* (como ascites em ratinhos).

Quando os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção se destinam a ser preparados usando métodos de DNA recombinante, o DNA codificando para os anticorpos monoclonais é prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (p.ex., usando sondas oligonucleotídicas que têm a capacidade de se ligar especificamente a genes que codificam para as

cadeias leves e pesadas de anticorpos murinos). As células de hibridoma aqui descritas servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vectores de expressão, os quais são então transfectados em células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo não produziriam a proteína de imunoglobulina, de modo a obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. As revisões de conjunto sobre a expressão recombinante em bactérias de DNA codificando para o anticorpo incluem Skerra et al. (1993) Curr. Opin. Immunol. 5:256 e Phickthun (1992) Immunol. Revs. 130:151. Como alternativa ao uso de hibridomas, o anticorpo poderá ser produzido numa linha celular tal como uma linha celular CHO, tal como exposto nas Patentes dos EUA nos. 5.545.403; 5.545.405 e 5.998.144. Abreviadamente, a linha celular é transfectada com vectores com a capacidade de expressar uma cadeia leve e uma cadeia pesada, respectivamente. Através da transfecção das duas proteínas em vectores separados, podem produzir-se anticorpos quiméricos. Outra vantagem consiste na glicosilação correcta do anticorpo.

Em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, é produzido em células CHO usando o sistema de expressão genética GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que utiliza a glutamina sintetase como marcador. Ver igualmente as Patentes dos EUA nos. 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.

Os anticorpos monoclonais contra o CD40 são já conhecidos neste campo técnico. Ver, por exemplo, as secções dedicadas aos antigénios de células B em McMichael, ed. (1987; 1989) Leukocyte Typing III e IV (Oxford University Press, New York);

Patentes dos EUA nos. 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; WO 00/63395; Publicações Internacionais nos. WO 02/28905 e WO 02/28904; Gordon et al. (1988) J. Immunol. 140:1425; Valle et al. (1989) Eur. J. Immunol. 19:1463; Clark et al. (1986) PNAS 83:4494; Paulie et al. (1989) J. Immunol. 142:590; Gordon et al. (1987) Eur. J. Immunol. 17:1535; Jabara et al. (1990) J. Exp. Med. 172:1861; Zhang et al. (1991) J. Immunol. 146:1836; Gascan et al. (1991) J. Immunol. 147:8; Banchereau et al. (1991) Clin. Immunol. Spectrum 3:8; e Banchereau et al. (1991) Science 251:70. De particular interesse para a presente invenção são os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos que partilham as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 acima descritos.

Adicionalmente, o termo "anticorpo anti-CD40", tal como aqui é usado, abrange anticorpos quiméricos anti-CD40; os anticorpos quiméricos anti-CD40 destinados para uso na invenção possuem as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui descritos. Por anticorpos "quiméricos" pretende-se referir anticorpos que são, preferencialmente, obtidos usando técnicas de DNA recombinante e que compreendem tanto componentes humanos (incluindo espécies imunologicamente "aparentadas", p.ex., chimpanzés) como componentes não humanos. Rituxan® é um exemplo de um anticorpo quimérico com uma região variável murina e uma região constante humana. Para os fins da presente invenção a região constante do anticorpo quimérico é, de preferência, substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo quimérico é de preferência obtida a partir de uma fonte não humana e possui a especificidade antigénica desejada face ao antigénio de superfície celular CD40. A fonte não humana poderá corresponder a qualquer fonte de vertebrado que possa

ser usada para gerar anticorpos contra um antígeno humano de superfície celular CD40 ou contra material que compreenda um antígeno humano de superfície celular CD40. Tais fontes não humanas incluem, de forma não limitativa, roedores (p.ex., coelho, rato, ratinho, etc.; ver, por exemplo, a Patente dos EUA nº 4.816.567) e primatas não humanos (p.ex., macaco do Velho Mundo, outros macacos, etc.; ver, por exemplo, as Patentes dos EUA nos. 5.750.105 e 5.756.096). Tal como aqui é usada, a expressão "imunologicamente activo", quando usada em referência a anticorpos quiméricos anti-CD40, indica um anticorpo quimérico que se liga ao CD40 humano.

Os anticorpos anti-CD40 humanizados constituem outros anticorpos anti-CD40 adequados para uso na presente invenção. O termo "humanizado" pretende referir formas de anticorpos anti-CD40 que contêm uma sequência mínima derivada de sequências de imunoglobulinas não humanas. Na sua maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais os resíduos de uma região hipervariável (também conhecida como região determinante da complementaridade ou CDR) do receptor são substituídas por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como o ratinho, rato, coelho, ou primata não humano possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. A expressão "região determinante da complementaridade" refere-se a sequências de aminoácidos que em conjunto definem a afinidade de ligação e a especificidade da região Fv' natural do local de ligação de uma imunoglobulina nativa. Ver, p.ex., Clothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Kabat et al. (1991) U.S. Dept. of Health and Human Services, Publicação NIH Nº 91-3242). O termo "região constante" refere-se à porção da molécula de anticorpo que confere as funções efectoras. Nos desenvolvimentos anteriores dirigidos para a produção de anticorpos não

imunogénicos destinados a uso na terapêutica de doenças humanas, as regiões constantes de ratinho foram substituídas por regiões constantes humanas. As regiões constantes dos anticorpos humanizados do indivíduo derivavam de imunoglobulinas humanas. No entanto, estes anticorpos humanizados ainda provocavam uma resposta imune indesejável e potencialmente perigosa em seres humanos e verificou-se uma perda de afinidade. Os anticorpos anti-CD40 humanizados para uso na presente invenção possuem características de ligação similares às exibidas pelos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui descritos.

A humanização pode essencialmente ser efectuada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536), substituindo sequências CDR de roedores ou sequências CDR mutantes de roedores pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano. Ver igualmente as Patentes dos EUA nos. 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Em alguns casos, os resíduos dentro das regiões de "framework" de uma ou mais regiões variáveis da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes (ver, por exemplo, as Patentes dos EUA nos. 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370). Adicionalmente, os anticorpos humanizados poderão compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor nem no anticorpo dador. Estas modificações são feitas para conseguir um refinamento adicional do desempenho do anticorpo (i.e., para obter a afinidade desejada). Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente o total de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, sendo que todas ou substancialmente todas as regiões hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas, ou substancialmente todas, as regiões de "framework" correspondem

às de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado compreenderá também, opcionalmente, pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes consultar Jones et al. (1986) Nature 331:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; e Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. Deste modo, tais anticorpos "humanizados" poderão incluir anticorpos nos quais substancialmente menos do que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos da CDR e possivelmente alguns resíduos de framework são substituídos por resíduos de locais análogos em anticorpos de roedores. Ver, por exemplo, as Patentes dos EUA nos. 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Ver também a Patente dos EUA nº 6.180.370 e Publicação Internacional Nº WO 01/27160, nas quais são expostos anticorpos humanizados e técnicas para a produção de anticorpos humanizados possuindo uma afinidade melhorada para um antigénio pré-determinado.

São também abrangidos pelo termo "anticorpos anti-CD40" os anticorpos anti-CD40 xenogénicos ou modificados produzidos num hospedeiro mamífero não humano, mais particularmente um ratinho transgénico, caracterizado por locus inactivados de imunoglobulinas (Ig) endógenas. Nestes animais transgénicos, os genes endógenos competentes para a expressão de subunidades leves e pesadas das imunoglobulinas do hospedeiro são colocados em situação de não funcionalidade e são substituídos pelos locus análogos de imunoglobulinas humanas. Estes animais transgénicos produzem anticorpos humanos na ausência substancial de subunidades leves ou pesadas das imunoglobulinas do hospedeiro. Ver, por exemplo, as Patentes dos EUA nos. 5.877.397 e 5.939.598.

De preferência, são obtidos anticorpos inteiramente humanos contra CD40 através da imunização de ratinhos transgênicos. Este tipo de ratinhos é obtido usando a tecnologia XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), que é exposta nas Patentes dos EUA nos. 6.075.181, 6.091.001 e 6.114.598. Para produzir os anticorpos aqui referidos, os ratinhos transgênicos para o locus de cadeia pesada de IgG₁ humana e para o locus de cadeia leve κ humana foram imunizados com células Sf9 que expressam CD40 humano. Os ratinhos podem ainda ser transgênicos para outros isotipos. Os anticorpos inteiramente humanos úteis na presente invenção são caracterizados por propriedades de ligação similares às exibidas pelos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui expostos.

Os fragmentos dos anticorpos anti-CD40 serão adequados para uso na invenção desde que retenham a desejada afinidade do anticorpo de extensão completa. Assim, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 reterá a capacidade de se ligar ao antígeno CD40 da superfície das células B. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades semelhantes às do anticorpo antagonista anti-CD40 de extensão completa correspondente, isto é, os fragmentos ligar-se-ão especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana e estão isentos de actividade agonista significativa mas exibem actividade antagonista quando ligados a um antígeno CD40 numa célula que expressa CD40 humano. Tais fragmentos são aqui referidos como fragmentos "de ligação ao antígeno".

Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo adequados compreendem uma porção de um anticorpo de extensão completa, geralmente a sua região de ligação ao antígeno ou a sua região variável. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem, de modo não limitativo, os fragmentos Fab, F(ab')₂ e

Fv e as moléculas de anticorpo de cadeia única. Por "Fab" entende-se um fragmento monovalente de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina que é composto pela cadeia leve e por parte da cadeia pesada. Por $F(ab')_2$ entende-se um fragmento bivalente de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina que contém ambas as cadeias leves e parte de ambas as cadeias pesadas. Os fragmentos de anticorpos de tipo "Fv de cadeia única" ou "sFv" são fragmentos que compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, sendo que estes domínios se encontram presentes numa só cadeia polipeptídica. Ver, por exemplo, as Patentes dos EUA nos. 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 e 5.856.456. Geralmente, o polipéptido Fv compreende ainda um linker polipeptídico entre os domínios V_H e V_L que permite que o sFv forme a estrutura desejada para a ligação ao antígeno. Para uma revisão dos sFv, ver Pluckthun (1994) em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg & Moore (Springer-Verlag, New York, págs. 269-315. Os fragmentos de ligação ao antígeno dos anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui expostos podem igualmente ser conjugados com uma citotoxina para efectuar a destruição das células-alvo, tal como abaixo se descreve.

Os anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas fágicas de anticorpos geradas usando as técnicas descritas em, por exemplo, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) e Patente dos EUA nº 5.514.548. Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628, e Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597, descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, usando bibliotecas fágicas. As publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (da gama dos nM) por rearranjo de cadeias (Marks et al. (1992) *Biol/Technology* 10:779-783), assim como a infecção combinatória e recombinação *in vivo* como estratégia para a

construção de bibliotecas fágicas de grande extensão (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2265-2266). Assim, estas técnicas constituem alternativas viáveis às técnicas tradicionais de hibridomas para o isolamento de anticorpos monoclonais.

Foram desenvolvidas diversas técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos derivavam da digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, p.ex., Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). No entanto, estes fragmentos podem agora ser directamente produzidos por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas fágicas de anticorpos acima referidas. Alternativamente, podem recuperar-se fragmentos Fab'-SH directamente a partir de *E. coli*, os quais podem ser quimicamente acoplados para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ poderão ser isolados directamente a partir da cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpos tornar-se-ão evidentes para o técnico experimentado.

Anticorpos antagonistas anti-CD40 úteis na presente invenção incluem os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui expostos, assim como anticorpos que diferem destes anticorpos mas retêm as CDRs; e anticorpos com uma ou mais adição(ões), deleção(ões) ou substituição(ões) de aminoácidos, sendo a actividade antagonista medida através da inibição da proliferação e/ou diferenciação das células B. A invenção abrange ainda os anticorpos antagonistas anti-CD40 desimunizados, que podem ser produzidos tal como descrito em, por exemplo, as Publicações Internacionais nos. WO 98/52976 e

WO 00/34317. Deste modo, os resíduos dos anticorpos antagonistas anti-CD40 desta invenção são modificados de modo a tornar os anticorpos não imunogénicos ou menos imunogénicos para os seres humanos, mantendo no entanto a sua actividade antagonista face às células humanas que expressam CD40, sendo tal actividade medida através dos ensaios apontados em outro local desta descrição. São também abrangidas pelo âmbito destas reivindicações as proteínas de fusão que compreendem um anticorpo antagonista anti-CD40 da invenção, ou um seu fragmento, podendo estas proteínas de fusão ser sintetizadas ou expressas a partir dos vectores polinucleotídicos correspondentes, tal como é já conhecido neste campo técnico. Tais proteínas de fusão estão descritas em referência à conjugação de anticorpos, tal como se refere mais adiante.

Os anticorpos da presente invenção poderão apresentar variações de sequência que são produzidas usando métodos descritos em, por exemplo, as Publicações de Patentes nos. EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 e WO 98/52976. Por exemplo, foi já demonstrado que as sequências contidas na CDR podem fazer com que um anticorpo se ligue às moléculas de classe II do MHC e desencadeie uma resposta indesejada por parte das células T helper. Uma substituição conservativa permitirá que o anticorpo retenha a actividade de ligação mas perca a capacidade de desencadear uma resposta indesejada por parte das células T. Quaisquer destas substituições, conservativas ou não conservativas, podem ser efectuadas usando métodos conhecidos da técnica, tais como os métodos referidos em outro local desta descrição, e os anticorpos resultantes estarão abrangidos pelo âmbito desta invenção. Os anticorpos variantes podem ser testados por métodos de rotina quanto à sua actividade antagonista, afinidade e especificidade usando os métodos aqui descritos.

Os anticorpos anti-CD40 úteis na prática da invenção podem ter um ou muitos mecanismos de acção. Um anticorpo produzido por qualquer dos métodos acima descritos, ou por outro método que aqui não tenha sido exposto, será abrangido pelo âmbito desta invenção se possuir pelo menos uma das seguintes actividades biológicas *in vitro* e/ou *in vivo*: inibição da secreção de imunoglobulinas por células B humanas periféricas normais estimuladas por células T; inibição da sobrevivência e/ou proliferação das células B humanas periféricas normais estimuladas por células que expressam o CD40L ou o ligando do CD40 soluvel (sCD40L); inibição da sobrevivência e/ou proliferação das células B humanas normais do sangue periférico estimuladas por células T Jurkat; inibição dos sinais intracelulares anti-apoptóticos "de sobrevivência" em qualquer célula estimulada por sCD40L ou por CD04L em fase sólida; e inibição da transdução de sinal por CD40 em qualquer célula após ligação a sCD40L ou a CD40L em fase sólida, delecção, anergia e/ou indução de tolerância nas células-alvo portadoras de CD40 ou em células portadoras de ligandos conhecidos para CD40, incluindo, de modo não limitativo, células T e células B, indução da expansão ou activação das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (ver, por exemplo, rejeição aloantigénio-específica de tecidos do dador mediada pela interferência de CD40-CD40L, van Maurik e tal. (2002) J. Immunol. 169:5401-5404), citotoxicidade através de qualquer mecanismo (incluindo, de modo não limitativo, citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos (ADCC), citotoxicidade dependente do complemento (CDC), regulação negativa da proliferação e/ou apoptose das células-alvo), modulação da secreção de citocinas e/ou da expressão de moléculas de superfície pelas células-alvo, e combinações destes efeitos. Os ensaios para estas actividades biológicas podem ser efectuados tal como aqui descrito. Ver igualmente os

ensaios descritos em Schultze et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444; e as Patentes dos EUA nos. 5.674.492 e 5.847.082.

Um ensaio representativo para a detecção de anticorpos antagonistas anti-CD40 específicos para os epitopos do antígeno CD40 aqui identificados é designado por "ensaio de ligação competitiva". Os ensaios de ligação competitiva são ensaios serológicos nos quais os anticorpos desconhecidos são detectados e quantificados em função da sua capacidade para inibir a ligação de um ligando marcado conhecido ao seu anticorpo específico. Estes ensaios são também referidos como ensaios de inibição competitiva. Num ensaio de ligação competitiva representativo, o polipéptido CD40 marcado é precipitado por anticorpos candidatos numa amostra, por exemplo, em combinação com anticorpos monoclonais dirigidos contra um ou mais epitopos dos anticorpos monoclonais da invenção. Os anticorpos anti-CD40 que reagem especificamente contra um epítipo de interesse podem ser identificados através do rastreio de uma série de anticorpos preparados contra uma proteína CD40 ou um fragmento da proteína que compreende o epítipo particular da proteína CD40 de interesse. Por exemplo, para o CD40 humano, os epitopos de interesse incluem epitopos que compreendem resíduos de aminoácidos lineares e/ou não lineares da isoforma curta do CD40 humano (ver o N° de Acesso Genbank NP_690593) apresentada na Figura 4B (SEQ ID NO:10), codificada pela sequência apresentada na Figura 4A (SEQ ID NO:9; ver também o N° de Acesso Genbank NM_152854), ou da isoforma longa do CD40 humano (ver os Nos. de Acesso Genbank

CAA43045 e NP_001241) apresentada na Figura 4D (SEQ ID NO:12), codificada pela sequência apresentada na Figura 4C (SEQ ID NO:11; ver os Nos. de Acesso Genbank X60592 e NM_001250). Alternativamente, poderão usar-se ensaios de ligação competitiva com anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados e previamente identificados com o fim de seleccionar anticorpos monoclonais comparáveis aos anticorpos previamente identificados.

Os anticorpos utilizados em tais imunoensaios poderão ser marcados ou não marcados. Os anticorpos não marcados poderão ser utilizados em aglutinação; os anticorpos marcados poderão ser usados numa grande variedade de ensaios, utilizando uma larga gama de marcadores. A detecção da formação de um complexo de anticorpo-antigénio entre um anticorpo anti-CD40 e um epitopo de interesse pode ser facilitada através da ligação de uma substância detectável ao anticorpo. Os meios de detecção adequados incluem o uso de marcadores tais como radionuclidos, enzimas, coenzimas, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminescentes, cromogénios, substratos ou co-factores enzimáticos, inibidores enzimáticos, complexos de grupos prostéticos, radicais livres, partículas, corantes e outros. Os exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; os exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes apropriados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; como exemplo de material luminescente encontra-se o luminol; os exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina; e os exemplos de materiais radioactivos adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H . Tais reagentes marcados podem ser usados em uma

variedade de ensaios bem conhecidos, tais como radioimunoensaios, enzimoimunoensaios, p.ex., ELISA, imunoensaios de fluorescência e semelhantes. Ver, por exemplo, as Patentes dos EUA Nos. 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; e 4.233.402.

Quaisquer dos anticorpos antagonistas anti-CD40 anteriormente descritos ou seus fragmentos podem ser conjugados antes de serem utilizados na presente invenção. Os métodos para a produção de anticorpos conjugados são conhecidos neste campo técnico. Assim, o anticorpo anti-CD40 pode ser marcado usando uma marcação indirecta ou uma abordagem de marcação indirecta. Os marcadores adequados incluem fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente ^{32}P e ^{125}I), reagentes densos aos electrões, enzimas e ligandos que possuem parceiros de ligação específica. Os enzimas são tipicamente detectados através da sua actividade. Por exemplo, a peroxidase de rábano é geralmente detectada através da sua capacidade para converter a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em um pigmento azul, quantificável com um espectrofotómetro. O termo "parceiro de ligação específica" refere-se a uma proteína que tem a capacidade de se ligar a uma molécula de ligando com uma elevada especificidade, como por exemplo no caso de um antigénio e de um anticorpo monoclonal específico para este. Outros parceiros de ligação específica incluem a biotina e a avidina ou a estreptavidina, IgG e proteína A, e os numerosos pares de receptor-ligando conhecidos da técnica. Deve notar-se que a descrição acima não pretende categorizar os diferentes marcadores em classes distintas, uma vez que o mesmo marcador pode funcionar de diversos modos. Por exemplo, a HRP poderá funcionar como uma enzima ou como um antigénio para um mAc. Ainda, podem combinar-se vários marcadores para obter o efeito desejado. Por exemplo, os mAc e a avidina requerem também

marcadores para a colocação em prática desta invenção; assim, poder-se-á marcar um mAc com biotina e detectar a sua presença com avidina marcada com ^{125}I , ou com um mAc anti-biotina marcado com HRP. Outras permutas e possibilidades se tornarão evidentes a um técnico de perícia média neste campo, sendo consideradas como equivalentes no âmbito da presente invenção.

Adicionalmente, um anticorpo (ou um seu fragmento) pode ser conjugado com uma porção terapêutica tal como um agente terapêutico, por exemplo. A porção molecular de fármaco pode ser uma proteína ou polipéptido possuindo uma actividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma proteína tal como a CTLA4-Ig, um anticorpo ou qualquer outra proteína; ou modificadores da resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, o factor de necrose tumoral, interferão alfa, interferão beta, factor de crescimento dos nervos, factor de crescimento derivado das plaquetas, activador do plasminogénio tecidual, BLyS (Estimulador dos Linfócitos B), interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulador das colónias de granulócitos/macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador das colónias de granulócitos ("G-CSF"), ou outros factores de crescimento.

As técnicas para a conjugação de tais porções moleculares terapêuticas com anticorpos são bem conhecidas. Ver, por exemplo, Arnon et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), págs. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2^a ed.; Marcel Dekker, Inc.), págs. 623-653; Thorpe (1985), *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al. págs. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic

Press, New York, 1985), págs. 303-316; e Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158.

Alternativamente, um anticorpo pode ser conjugado com um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo, tal como descrito na Patente dos EUA N° 4.676.980. Adicionalmente, poderão usar-se linkers entre os marcadores e os anticorpos da invenção (ver a Patente dos EUA N° 4.831.175). Os anticorpos, ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio, poderão ser directamente ou indirectamente marcados (Patente dos EUA N° 5.595.721). O tratamento poderá consistir numa combinação do tratamento com anticorpos conjugados e não conjugados administrados simultaneamente ou subsequentemente (WO 00/52031 e WO 00/52473).

Variantes de Anticorpos Antagonistas Anti-CD40

Poderão usar-se variantes biologicamente activas apropriadas dos anticorpos antagonistas anti-CD40 na presente invenção. Tais variantes reterão as propriedades de ligação desejadas do anticorpo antagonista anti-CD40 progenitor. Os métodos para a produção de variantes de anticorpos estão bastante difundidos neste campo técnico.

Por exemplo, podem preparar-se variantes de sequências de aminoácidos de um anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 aqui descritos, efectuando mutações na sequência de DNA clonada que codifica para o anticorpo de interesse. Os métodos de mutagénese e alteração de sequências nucleotídicas são bem conhecidos da técnica. Ver, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); Patente dos

EUA N° 4.873.192; e as referências aí citadas. Podem encontrar-se orientações sobre substituições apropriadas de aminoácidos que não afectam a actividade biológica do polipéptido de interesse no modelo de Dayhoff et al. (1978), em Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). As substituições conservativas, tais como a troca de um aminoácido por outro com propriedades semelhantes, poderão ser preferidas. Os exemplos de substituições conservativas incluem, de modo não limitativo, Gly<->Ala, Val<->Ile<->Leu, Asp<->Glu, Lys<->Arg, Asn<->Gln, e Phe<->Trp<->Tyr.

Na construção de variantes do polipéptido que constitui o anticorpo antagonista anti-CD40 de interesse, são feitas modificações de modo a que as variantes continuem a possuir a actividade desejada, i.e., uma afinidade de ligação semelhante, a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana e ausência de actividade agonista significativa, exibindo por outro lado actividade antagonista quando em ligação a um antígeno CD40 numa célula humana que expressa CD40. Obviamente, quaisquer mutações efectuadas no DNA codificando para o polipéptido variante não devem colocar a sequência fora do molde de leitura e, preferencialmente, não criarão regiões complementares que poderiam produzir uma estrutura secundária de mRNA. Ver a Publicação do Pedido de Patente EP N° 75.444.

Adicionalmente, a região constante de um anticorpo antagonista anti-CD40 pode ser alvo de mutação de modo a alterar a função efectora de diversos modos. Por exemplo, ver a Patente dos EUA N° 6.737.056B1 e a Publicação do Pedido de Patente US N° 2004/0132101A1, que expõem mutações dos Fc que optimizam a ligação dos anticorpos aos receptores de Fc.

Preferencialmente, as variantes de um anticorpo antagonista anti-CD40 de referência possuem sequências de aminoácidos que têm pelo menos 70% ou 75% de identidade de sequência, preferencialmente pelo menos 80% ou 85% de identidade de sequência, mais preferencialmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos da molécula de referência de anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 aqui descritos, ou com uma porção mais curta da molécula de referência do anticorpo. Mais preferencialmente, as moléculas partilham uma identidade de sequência de pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99%. Para os fins da presente invenção, a percentagem de identidade de sequência é determinada usando o algoritmo de busca de homologias de Smith-Waterman, usando uma análise de espaçamentos (*gaps*) com os parâmetros de *gap open penalty* de 12 e *gap extension penalty* de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de busca de homologias de Smith-Waterman é exposto em Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Uma variante poderá, por exemplo, diferir do anticorpo antagonista anti-CD40 de referência em apenas 1 a 15 resíduos de aminoácidos, apenas 1 a 10 resíduos de aminoácidos, tal como apenas 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2, ou até apenas 1 resíduo de aminoácido.

No que diz respeito ao alinhamento óptimo de duas sequências de aminoácidos, o segmento contíguo da sequência variante de aminoácidos poderá ter resíduos adicionais de aminoácidos ou ter sofrido uma deleção de aminoácidos relativamente à sequência de aminoácidos de referência. O segmento contíguo usado para comparação com a sequência de aminoácidos de referência incluirá pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, podendo chegar a 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácidos. Podem estabelecer-se correcções quanto à identidade de sequência associadas a substituições

conservativas de resíduos de aminoácidos ou a espaçamentos na sequência (ver o algoritmo de busca de homologias de Smith-Waterman).

A estrutura química precisa de um polipéptido que tem a capacidade de se ligar especificamente ao CD40 e de reter a actividade antagonista, particularmente quando ligado ao antigénio CD40 em células B malignas, depende de diversos factores. Uma vez que se encontram presentes na molécula grupos amino e carboxilo ionizáveis, poderá obter-se um polipéptido particular sob a forma de sal ácido ou básico, ou na forma neutra. Todas as preparações deste tipo que retenham a sua actividade biológica quando colocadas em condições ambientais adequadas são incluídas na definição de anticorpos antagonistas anti-CD40, tal como aqui é usada. Ainda, a sequência primária de aminoácidos do polipéptido poderá ser aumentada por derivatização usando porções moleculares de açúcar (glicosilação) ou outras moléculas suplementares tais como lípidos, fosfato, grupos acetilo e semelhantes. A sequência poderá ainda ser aumentada por conjugação com sacáridos. Certos aspectos de tal aumento são atingidos através dos sistemas de processamento pós-tradução do hospedeiro produtor; outras modificações poderão ser introduzidas *in vitro*. Em qualquer caso, tais modificações são incluídas na definição de um anticorpo anti-CD40 tal como aqui é usada, com a ressalva de que as propriedades antagonistas do anticorpo anti-CD40 não sejam destruídas. Será de esperar que tais modificações possam afectar quantitativa ou qualitativamente a actividade, aumentando ou reduzindo a actividade do polipéptido, nos diversos ensaios. Ainda, os resíduos individuais de aminoácidos na cadeia poderão ser modificados por oxidação, redução ou outra derivatização, e o polipéptido poderá ser submetido a corte para obter fragmentos que retêm a actividade. Tais alterações que não destroem a

actividade antagonista não afastam a sequência polipeptídica da definição de anticorpos anti-CD40 de interesse, tal como esta é aqui usada.

Os desenvolvimentos técnicos neste campo fornecem orientações substanciais relativas à preparação e uso de variantes polipeptídicas. Na preparação de variantes dos anticorpos anti-CD40, um perito na técnica poderá prontamente determinar as modificações da sequência de nucleótidos ou da sequência de aminoácidos da proteína nativa que resultarão numa variante adequada para uso como um componente terapeuticamente activo de uma composição farmacêutica usados nos métodos aqui revelados.

Métodos Terapêuticos Utilizando os Anticorpos Antagonistas Anti-CD40 da Invenção

Os métodos aqui apresentados são dirigidos ao uso de anticorpos antagonistas anti-CD40 no tratamento de indivíduos (i.e., pacientes) que sofrem de doenças auto-imunes e/ou inflamatórias, ou de uma predisposição para desenvolver uma doença auto-imune e/ou inflamatória, nos quais a doença e/ou a inflamação é mediada pela sinalização por CD40 mediada por ligando de CD40 em células que expressam o antígeno CD40. Por "células que expressam CD40" pretende-se referir células que expressam o antígeno CD40. Os métodos para a detecção da expressão de CD40 em células são bem conhecidos da técnica e incluem, de modo não limitativo, técnicas de PCR, imunohistoquímica, citometria de fluxo, Western blot, ELISA e semelhantes.

Os métodos aqui expostos são especialmente úteis para o tratamento de doenças inflamatórias e/ou autoimunes nas quais está envolvida a estimulação por CD40 mediada por CD40L. As composições da invenção poderão ser administradas

profilacticamente ou terapeuticamente, ou numa combinação destas acções.

As doenças inflamatórias são caracterizadas por inflamação e por destruição de tecidos, ou por uma combinação destas. O termo "doença inflamatória" inclui qualquer processo inflamatório mediado por via imune em que o evento iniciador ou o alvo da resposta imune envolve antigénio(s) de não-self, incluindo, por exemplo, aloantigénios, xenoantigénios, antigénios virais, antigénios bacterianos, antigénios desconhecidos ou alergenos.

Adicionalmente, para os fins da presente invenção, o termo "doença(s) inflamatória(s)" inclui "doença(s) autoimune(s)". Tal como aqui é usado, o termo "autoimunidade" é de modo geral entendido como abrangendo processos inflamatórios mediados por via imune que envolvem os antigénios do "self". Nas doenças autoimunes, o(s) antigénio(s) do self desencadeiam respostas imunes por parte do hospedeiro.

Ainda, a presente exposição inclui o tratamento da inflamação associada com a rejeição de um transplante de tecidos. Os termos "rejeição de transplante " ou "rejeição de enxerto" refere-se a qualquer resposta immune produzida pelo hospedeiro contra um enxerto, incluindo, de modo não limitativo, antigénios HLA, antigénios dos grupos sanguíneos e semelhantes.

A invenção pode ainda ser usada para tratar a doença de enxerto versus hospedeiro, tal como a associada ao transplante de medula óssea, por exemplo. Numa tal doença de enxerto versus hospedeiro, a medula óssea dadora inclui linfócitos e células que sofrem maturação até linfócitos. Os linfócitos da medula dadora reconhecem os antigénios do receptor como sendo não-self e desenvolvem uma resposta imune inflamatória. Assim, tal como aqui são usados, os termos "doença de enxerto versus hospedeiro" ou "reacção de enxerto versus hospedeiro" referem-

se a qualquer resposta imune mediada por células T na qual os linfócitos dadores reagem com os antígenos do hospedeiro.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 e seus fragmentos de ligação ao antígeno aqui descritos podem ser usados de acordo com a invenção para tratar distúrbios autoimunes e/ou inflamatórios que incluem, de modo não limitativo, lúpus eritematoso sistémico (LES), lúpus discóide, lúpus nefrítico, sarcoidose, artrite inflamatória, incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante e artrite gotosa, rejeição de um transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crónica e/ou doença de 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, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença por complexos imunes, síndrome de disfunção imune e fadiga crónica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinémia, trombólise, cardiomiopatia, pênfigo, fibrose pulmonar intersticial, diabetes mellitus Tipo I e Tipo II, hipersensibilidade retardada dos tipos 1, 2, 3 e 4, alergias ou distúrbios alérgicos, respostas imunes indesejadas/inesperadas a proteínas terapêuticas (ver, por exemplo, o Pedido de Patente dos EUA No. US 2002/0119151 e Koren et al. (2002) Curr. Pharm. Biotechnol. 3:349-60), asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite alérgica e de irritação por contacto, urticária, alergias mediadas por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer, polineuropatia inflamatória desmielinizante crónica

e semelhantes. Em outras formas de realização, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são úteis no tratamento de inflamações pulmonares, incluindo, de modo não limitativo, rejeição de transplante de pulmão, asma, sarcoidose, enfisema, fibrose quística, fibrose pulmonar idiopática, bronquite crónica, rinite alérgica e doenças alérgicas do pulmão tais como pneumonite por hipersensibilidade, pneumonia eosinofílica, bronquiolite obliterante devida a transplante de medula óssea e/ou pulmão ou a outras causas, aterosclerose do enxerto/flebosclerose do enxerto, assim como fibrose pulmonar resultante de doenças do colagénio, vasculares e autoimunes como a artrite reumatóide e o lúpus eritematoso.

O termo "tratamento" é aqui definido como a aplicação ou administração de um anticorpo antagonista anti-CD40, ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, a um indivíduo, ou a aplicação ou administração de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento a um tecido ou linha celular isolados de um indivíduo, sendo que o indivíduo sofre de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, de um sintoma associado à doença autoimune e/ou doença inflamatória ou de uma predisposição para o desenvolvimento da doença autoimune e/ou doença inflamatória, sendo o propósito desta aplicação ou administração o de curar, aliviar, alterar, remediar, melhorar ou afectar a doença autoimune e/ou doença inflamatória, quaisquer sintomas associados à doença autoimune e/ou doença inflamatória ou a predisposição para o desenvolvimento da doença autoimune e/ou doença inflamatória. Por "tratamento" pretende-se também significar a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo os anticorpos antagonistas anti-CD40 ou seu fragmento de ligação ao antigénio a um indivíduo, ou a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo os anticorpos anti-CD40 ou seus fragmentos a um tecido ou linha celular isolados

de um indivíduo, o qual sofre de doença autoimune e/ou doença inflamatória, um sintoma de doença autoimune e/ou doença inflamatória ou uma predisposição para o desenvolvimento da doença autoimune e/ou doença inflamatória, sendo o propósito desta aplicação ou administração o de curar, aliviar, alterar, remediar, melhorar ou afectar a doença autoimune e/ou doença inflamatória, quaisquer sintomas associados à doença autoimune e/ou doença inflamatória ou a predisposição para o desenvolvimento da doença autoimune e/ou doença inflamatória.

Por "actividade anti-inflamatória" pretende-se indicar uma redução ou prevenção da inflamação. A terapêutica com pelo menos um anticorpo antagonista anti-CD40 (ou um seu fragmento de ligação ao antigénio) tal como definido em outro local desta exposição causa uma resposta fisiológica que é benéfica no que respeita ao tratamento de uma doença autoimune e/ou uma doença inflamatória, nos casos em que a doença envolve células que expressam o antigénio CD40. Reconhece-se que os métodos aqui expostos podem ser úteis na prevenção da alteração fenotípica das células, tal como a proliferação, activação e semelhantes.

De acordo com os métodos aqui descritos, pelo menos um anticorpo antagonista anti-CD40 (ou um seu fragmento de ligação ao antigénio), tal como definido em outro local desta descrição, são usados para promover uma resposta terapêutica positiva relativamente ao tratamento ou prevenção de uma doença auto-imune e/ou inflamatória. Por "resposta terapêutica positiva" relativamente a uma doença auto-imune e/ou inflamatória pretende-se indicar uma melhoria da doença em associação à actividade anti-inflamatória destes anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antigénio, e/ou uma melhoria dos sintomas associados à doença. Assim, pode observar-se um efeito anti-proliferativo, a prevenção da proliferação adicional das células que expressam CD40, uma redução da

resposta inflamatória que inclui, de modo não limitativo, a redução da secreção de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, proteases, imunoglobulinas (nos casos em que a célula portadora de CD40 é uma célula B), combinações destes efeitos, e semelhantes, produção aumentada de proteínas anti-inflamatórias, redução do número de células autoreactivas, aumento da tolerância imunológica, inibição da sobrevivência das células autoreactivas e/ou diminuição de um ou mais sintomas mediados pela estimulação das células que expressam CD40. Tais respostas terapêuticas positivas não estão sujeitas a limitações quanto à via de administração e poderão compreender a administração ao dador, ao tecido do dador (tal como, por exemplo, na perfusão de órgãos), ao hospedeiro, a qualquer combinação destes, e semelhantes.

A resposta clínica pode ser avaliada usando técnicas de avaliação tais como imagiologia por ressonância magnética (IRM), imagiologia por raios X, tomografia axial computadorizada (TAC), citometria de fluxo ou análise de separação de células activadas por fluorescência (FACS), histologia, patologia macroscópica e química do sangue, incluindo, de modo não limitativo, as alterações detectáveis por ELISA, RIA, cromatografia e semelhantes. Para além destas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo submetido a terapêutica com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antigénio poderá experienciar o efeito benéfico de uma melhoria dos sintomas associados à doença.

Os termos "dose ou quantidade terapêuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" pretendem indicar uma quantidade de anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio que, quando administrada, induz uma resposta terapêutica positiva no que diz respeito ao tratamento de um paciente com uma doença auto-imune e/ou inflamatória. Em algumas formas de realização da invenção, uma

dose terapeuticamente eficaz de anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento varia entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 40 mg/kg, entre cerca de 0,01 mg/kg e cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 0,1 mg/kg e cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg e cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg e cerca de 25 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg e cerca de 20 mg/kg, entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 15 mg/kg, ou entre cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. É reconhecido que o método de tratamento poderá compreender uma só administração de uma dose terapeuticamente eficaz ou múltiplas administrações de uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40 ou do seu fragmento de ligação ao antigénio.

Uma outra forma de realização desta exposição consiste no uso de anticorpos antagonistas anti-CD40 para a monitorização diagnóstica dos níveis de proteínas nos tecidos como parte de um procedimento de teste clínico, p.ex., para determinar a eficácia de um dado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada através do acoplamento do anticorpo a uma substância detectável. Os exemplos de substâncias detectáveis incluem diversos enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais radioactivos. Os exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; os exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui o luminol; os exemplos de materiais bioluminescentes incluem

luciferase, luciferina e aequorina; e os exemplos de materiais radioactivos adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio adequados, podem ser usados em combinação com quaisquer terapêuticas conhecidas para doenças auto-imunes e inflamatórias, incluindo qualquer agente ou combinação de agentes de utilidade reconhecida, ou que tenham já sido usados ou se encontrem actualmente em uso, no tratamento de doenças auto-imunes e inflamatórias. Tais terapêuticas e agentes terapêuticos incluem, de modo não limitativo, cirurgia ou procedimentos cirúrgicos (p.ex., esplenectomia, linfadenectomia, tiroidetomia, plasmaferese, leucoferese, transplante de células, tecidos ou órgãos, procedimentos de intervenção intestinal, perfusão de órgãos e semelhantes), radioterapia, terapêuticas tais como terapêutica com esteróides e terapêutica não-esteróide, terapêutica hormonal, terapêutica com citocinas, terapêutica com agentes dermatológicos (por exemplo, agentes tópicos usados para tratar alterações da pele tais como alergias, dermatite de contacto e psoríase), terapêutica imunossupressora, outras terapêuticas anti-inflamatórias com anticorpos monoclonais, e semelhantes. Deste modo, os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio, são administrados em combinação com pelo menos uma outra terapêutica, incluindo, de modo não limitativo, cirurgia, perfusão de órgãos, radioterapia, terapêutica com esteróides, terapêutica não-esteróide, terapêutica antibiótica, terapêutica antifúngica, terapêutica hormonal, terapêutica com citocinas, terapêutica com agentes dermatológicos (por exemplo, agentes tópicos usados para tratar alterações da pele tais como alergias, dermatite de contacto e psoríase), terapêutica imunossupressora, outras terapêuticas anti-inflamatórias com anticorpos monoclonais, combinações destas,

e semelhantes. Assim, quando as terapêuticas combinadas compreendem a administração de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio em combinação com a administração de outro agente terapêutico, tal como por exemplo os esteróides, os métodos aqui expostos abrangem a coadministração, usando formulações separadas ou uma só formulação farmacêutica, e a administração consecutiva por qualquer ordem.

Quando os métodos aqui expostos compreendem regimes terapêuticos combinados, estas terapias poderão ser administradas em simultâneo, i.e., o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antigénio é administrado concomitantemente ou na mesma moldura temporal que a outra terapêutica (i.e., as terapias são administradas concomitantemente, mas o anticorpo anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antigénio não é administrado precisamente ao mesmo tempo que a outra terapêutica). Alternativamente, o anticorpo antagonista anti-CD40 da presente invenção, ou o seu fragmento de ligação ao antigénio, poderá igualmente ser administrado antes ou depois da outra terapêutica. A administração sequencial das diferentes terapêuticas pode ser efectuada independentemente de o indivíduo tratado ter respondido ou não ao primeiro curso de terapia para reduzir a possibilidade de recidivas.

Em algumas formas de realização da exposição, os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, ou os seus fragmentos de ligação ao antigénio, são administrados em combinação com fármacos imunossupressores ou com fármacos anti-inflamatórios, sendo que o anticorpo e o(s) agente(s) terapêutico(s) podem ser administrados sequencialmente, por qualquer ordem, ou simultaneamente (i.e., concorrentemente ou dentro da mesma janela temporal). Os exemplos de fármacos imunossupressores adequados que podem ser administrados em

combinação com os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção incluem, de modo não limitativo, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tal como, por exemplo, ciclosporina em aerosol (ver a Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. US20020006901), tacrolimus (FK506; ProGraf™), micofenolato de mofetil e azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxispergualina, leflunomida e os seus análogos de malononitriloamida; e proteínas imunossupressoras, incluindo, por exemplo, anticorpos anti-CTLA4 e fusões com Ig, anticorpos anti-Estimulador de Linfócitos B (p.ex., LYMPHOSTAT-B™) e fusões com Ig (BLyS-Ig), anticorpos anti-CD80 e etanercept (Enbrel®), assim como anticorpos anti-células T tais como o anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, e semelhantes. Os exemplos de agentes anti-inflamatórios adequados incluem, de modo não limitativo, corticosteróides tais como, por exemplo, clobetasol, halobetasol, hidrocortisona, triamcinolona, betametasona, fluocinol, fluocinonida, prednisona, prednisolona, metilprednisolona; fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) tais como, por exemplo, sulfasalazina, medicamentos contendo mesalamina (conhecidos como agentes 5-ASA), celecoxib, diclofenac, etodolac, fenprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, cetoprofeno, meclofamato, meloxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salicilatos, sulindac e tolmetina; anticorpos anti-inflamatórios tais como adalimumab (HUMIRA®, um antagonista de TNF- α) e infliximab (Remicade®, um antagonista de TNF- α), e semelhantes.

A rejeição de transplantes e a doença de enxerto versus hospedeiro podem ser hiperagudas (humorais), agudas (mediadas por células T), ou crónicas (etiologia desconhecida), ou resultar de uma combinação destes elementos. Assim, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são usados em algumas formas de realização para prevenir e/ou atenuar a

rejeição e/ou os sintomas associados à rejeição hiperaguda, aguda e/ou crónica do transplante de qualquer tecido, incluindo, de modo não limitativo, fígado, rim, pâncreas, células dos ilhéus pancreáticos, intestino delgado, pulmão, coração, córneas, pele, vasos sanguíneos, osso, medula óssea heteróloga ou autóloga, e semelhantes. Os tecidos para enxerto podem ser obtidos a partir de qualquer dador e ser transplantados em qualquer hospedeiro receptor, e assim o procedimento de transplante pode compreender o transplante de tecido animal para indivíduos humanos (p.ex., xenoenxertos), transplante de tecido de um indivíduo humano para outro humano (p.ex., aloenxertos), e/ou transplante de tecido de uma parte de um corpo humano para outra parte do mesmo corpo (p.ex., autoenxertos). O tratamento com os anticorpos da invenção podem também reduzir as sequelas do transplante tais como febre, anorexia, anomalias hemodinâmicas, leucopénia, infiltração por glóbulos brancos do órgão/tecido transplantado, assim como as infecções oportunistas.

Em algumas formas de realização, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção podem ser usados isoladamente ou em combinação com fármacos imunossupressores para tratar e/ou prevenir a rejeição de transplantes como a rejeição hiperaguda, aguda e/ou crónica e/ou a doença de enxerto versus hospedeiro. Assim, em algumas formas de realização em que os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são usados para tratar a rejeição de enxertos, os anticorpos podem ser usados em combinação com fármacos imunossupressores adequados, incluindo, de modo não limitativo, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tal como, por exemplo, ciclosporina em aerosol (ver a Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. US20020006901), tacrolimus (FK506; ProGraf™), micofenolato de mofetil e azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus

(rapamicina), desoxispergualina, leflunomida e os seus análogos de malononitriloamida; e proteínas imunossupressoras, incluindo, por exemplo, anticorpos anti-CTLA e fusões com Ig, anticorpos anti-Estimulador de Linfócitos B (p.ex., LYMPHOSTAT-B™) e fusões com Ig (BLyS-Ig), anticorpos anti-CD80 e etanercept (Enbrel®), assim como anticorpos anti-células T tais como o anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, e semelhantes.

Assim, a invenção contempla especificamente que as composições e métodos aqui expostos sejam usados em combinação com outros fármacos para reforçar a melhoria dos sintomas e dos resultados dos receptores de transplante, como os receptores de transplantes de pulmão, por exemplo. Assim, em algumas formas de realização, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são usados para tratar a rejeição de transplantes (como por exemplo a rejeição hiperaguda, aguda e/ou crónica ou a doença de enxerto versus hospedeiro em receptores de transplante de pulmão) isoladamente ou em combinação com ciclosporina administrada por via parentérica e/ou não parentérica, incluindo por exemplo ciclosporina oral, ciclosporina injectável, ciclosporina aerosolizada (p.ex., inalada) e combinações destas. Em algumas formas de realização em que pelo menos um componente terapêutico é a ciclosporina aerosolizada, a ciclosporina é administrada ao pulmão do receptor por inalação da ciclosporina sob a forma de spray de aerosol usando, por exemplo, um dispositivo de administração pressurizado ou nebulizador. A ciclosporina pode ser administrada sob a forma de pó seco ou em forma molhada.

Em outras formas de realização, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção podem ser usados isoladamente ou em combinação com fármacos imunossupressores no tratamento e/ou profilaxia da artrite reumatóide. Assim, em algumas formas de realização em que os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são usados para tratar a artrite reumatóide, os

anticorpos podem ser usados em combinação com fármacos imunossupressores adequados, incluindo, de modo não limitativo, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tacrolimus (FK506; PROGRAF™), micofenolato de mofetil e azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxispergualina, leflunomida e os seus análogos de malononitriloamida; e proteínas imunossupressoras, incluindo, por exemplo, anticorpos anti-CTLA e fusões com Ig, anticorpos anti-Estimulador de Linfócitos B (p.ex., LYMPHOSTAT-B™) e fusões com Ig (BLyS-Ig), anticorpos anti-CD20 (p.ex., RITUXAN®); o anticorpo inteiramente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131, tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®); anticorpos anti-CD80 e etanercept (Enbrel®), assim como anticorpos anti-células T tais como o anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, e semelhantes. Tal como acima se expõe, a eficácia do tratamento pode ser avaliada por quaisquer meios, incluindo, de modo não limitativo, a medição da eficácia através das respostas clínicas definidas pelos critérios do American College of Rheumatology, do European League of Rheumatism, ou por quaisquer outros critérios. Ver, por exemplo, Felson et al. (1995) *Arthritis. Rheum.* 38:727-35 e van Gestel et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39:34-40.

Em ainda outras formas de realização, os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção podem ser usados isoladamente ou em combinação com fármacos imunossupressores no tratamento e/ou profilaxia da esclerose múltipla. Assim, em algumas formas de realização em que os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são usados para tratar a esclerose múltipla, os anticorpos podem ser usados em combinação com fármacos imunossupressores adequados, incluindo, de modo não limitativo, metotrexato, ciclofosfamida, mizoribina, clorambucil, ciclosporina, tacrolimus (FK506; PROGRAF™),

micofenolato de mofetil e azatioprina (6-mercaptopurina), sirolimus (rapamicina), desoxispergualina, leflunomida e o seu análogo de malononitriloamida; e proteínas imunossupressoras, incluindo, por exemplo, anticorpos anti-CTLA e fusões com Ig, anticorpos anti-estimulador de linfócitos B (p.ex., LYMPHOSTAT-B™) e fusões com Ig (BLyS-Ig), anticorpos anti-CD20 (p.ex., RITUXAN®); o anticorpo inteiramente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131, tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®); anticorpos anti-CD80 e etanercept (Enbrel®), assim como anticorpos anti-células T tais como o anti-CD3 (OKT3), anti-CD4, e semelhantes.

Formulações Farmacêuticas e Modos de Administração

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 desta invenção são administrados a uma concentração que é terapeuticamente eficaz para evitar ou tratar as doenças auto-imunes e/ou inflamatórias. Para atingir este objectivo, os anticorpos poderão ser formulados usando uma variedade de excipientes aceitáveis conhecidos da técnica. Tipicamente, os anticorpos são administrados por injeção quer intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Os métodos para realizar esta administração são conhecidos dos técnicos de perícia média. É igualmente possível obter composições que podem ser administradas por via tópica ou oral, ou que podem ser transmitidas através das membranas mucosas.

A administração intravenosa ocorre preferencialmente por infusão ao longo de um período de cerca de 1 até cerca de 10 horas, mais preferencialmente ao longo de cerca de 1 até cerca de 8 horas, ainda mais preferencialmente ao longo de cerca de 2 até cerca de 7 horas, e mais preferencialmente ainda ao longo de cerca de 4 até cerca de 6 horas, dependendo do anticorpo anti-CD40 a administrar. A infusão inicial da

composição farmacêutica poderá ser administrada ao longo de um período de cerca de 4 até cerca de 6 horas, sendo as infusões subsequentes administradas mais rapidamente. As infusões subsequentes podem ser administradas ao longo de um período de cerca de 1 até cerca de 6 horas, incluindo, por exemplo, cerca de 1 até cerca de 4 horas, cerca de 1 até cerca de 3 horas, ou cerca de 1 até cerca de 2 horas.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a sua via de administração pretendida. Os exemplos de vias de administração possíveis incluem a administração parentérica (p.ex., intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutânea (SC) ou infusão), oral e pulmonar (p.ex., inalação), nasal, transdérmica (tópica), transmucosa e rectal. As soluções ou suspensões usadas para aplicação parentérica, intradérmica ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril como a água para injeção, soro fisiológico, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico e metilparabenos; antioxidantes como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes como o ácido etilenodiaminatetraacético; tampões como os 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 e bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser armazenada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos multidose de vidro ou de plástico.

Os anticorpos anti-CD40 são tipicamente fornecidos por técnicas padronizadas num tampão farmacêuticamente aceitável, por exemplo, soro fisiológico estéril, água tamponada estéril, propilenoglicol, combinações dos anteriores, etc. Os métodos de preparação dos agentes administráveis por via parentérica

estão descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a Ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990). Ver também, por exemplo, WO 98/56418, que descreve as formulações farmacêuticas estabilizadas de anticorpos adequadas para uso na presente invenção.

A quantidade de pelo menos um anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento a administrar é prontamente determinada por um técnico de perícia média sem necessidade de recorrer a experimentação indevida. Os factores que influenciam o modo de administração e a quantidade respectiva de pelo menos um anticorpo antagonista anti-CD40 (ou um seu fragmento) incluem, de modo não limitativo, a doença particular que é alvo do tratamento, a gravidade da doença, a história da doença, e a idade, altura, peso, estado de saúde e forma física do indivíduo a tratar. De forma similar, a quantidade de anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento a administrar será dependente do modo de administração e de o regime a aplicar ao indivíduo prever uma dose única ou doses múltiplas deste agente. Geralmente, é preferida uma dose mais elevada de anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento em função do maior peso do indivíduo a tratar. A dose de anticorpo anti-CD40 ou do seu fragmento a administrar encontra-se no intervalo de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, preferencialmente no intervalo de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg. Assim, por exemplo, a dose poderá ser de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 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.

Em outra forma de realização desta exposição, o método compreende a administração de doses múltiplas do anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento. O método poderá 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 compreendendo um anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento. A frequência e duração de administração de doses múltiplas das composições farmacêuticas compreendendo o anticorpo anti-CD40 ou um seu fragmento poderão ser facilmente determinadas por um perito na técnica sem o recurso a experimentação indevida. Ainda, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo pode incluir um só tratamento ou, preferencialmente, pode incluir uma série de tratamentos. Num exemplo preferido, um indivíduo é tratado com anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio em quantidades no intervalo de entre cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana durante cerca de 1 a 10 semanas, preferencialmente durante cerca de 2 a 8 semanas, mais preferencialmente durante cerca de 3 a 7 semanas, e ainda mais preferencialmente durante cerca de 4, 5 ou 6 semanas. O tratamento poderá realizar-se anualmente para prevenir as recidivas ou por indicação da ocorrência de uma recidiva. Deve ainda ter-se em conta que a dosagem eficaz do anticorpo, ou do seu fragmento de ligação ao antigénio, usada para o tratamento pode aumentar ou diminuir ao longo do curso de um tratamento em particular. As alterações de dosagem poderão resultar de, e mostrar-se necessárias a partir de, resultados de ensaios de diagnóstico tais como os acima descritos. Assim, numa das formas de realização, o regime de dosagem inclui uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento aos dias 1, 7, 14 e 21 de um período de tratamento. Em outra forma de realização, o regime de dosagem inclui uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento aos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 de uma semana num

período de tratamento. Outras formas de realização incluem um regime de dosagem com uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento aos dias 1, 3, 5 e 7 de uma semana num período de tratamento; um regime de dosagem incluindo uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento aos dias 1 e 3 de uma semana num período de tratamento; e um regime de dosagem preferido incluindo uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou de um seu fragmento ao dia 1 de uma semana num período de tratamento. O período de tratamento poderá compreender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, um mês, 3 meses, 6 meses ou um ano. Os períodos de tratamento poderão ser subsequentes ou separados entre si por um dia, uma semana, 2 semanas, um mês, 3 meses, 6 meses ou um ano.

Em algumas formas de realização, as doses terapeuticamente eficazes de anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio variam entre cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, entre cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, entre cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, entre cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, ou entre cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. Assim, por exemplo, a dose de um qualquer anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio, por exemplo o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, poderá ser de 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 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, 50 mg/kg, ou quaisquer outras doses dentro do intervalo de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg. Poderá ser administrada a mesma dose terapêuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno ao longo de cada semana de dosagem com anticorpo. Alternativamente, poderão usar-se diferentes doses terapêuticamente eficazes de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno ao longo do curso de um período de tratamento.

Em algumas formas de realização, a dose terapêuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno, tal como definido em outro local desta exposição, pode encontrar-se na gama de dosagens mais baixa (i.e., de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg), encontrando-se as doses subsequentes na gama de dosagens mais elevada (i.e., de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg).

Em formas de realização alternativas, a dose terapêuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno, tal como definido em outro local desta exposição, pode encontrar-se na gama de dosagens mais elevada (i.e., de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg), encontrando-se as doses subsequentes na gama de dosagens mais baixa (i.e., de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg). Assim, em uma forma de realização, a dose terapêuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno é de cerca de 20 mg/kg a cerca de 35 mg/kg, incluindo cerca de 20 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 30 mg/kg e cerca de 35 mg/kg, e as doses terapêuticamente eficazes subsequentes de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno são de cerca de 5

mg/kg a cerca de 15 mg/kg, incluindo cerca de 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg e cerca de 15 mg/kg.

Em algumas das formas de realização da invenção, a terapêutica com anticorpo antagonista anti-CD40 é iniciada pela administração de uma "dose de carga" do anticorpo ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno ao indivíduo que necessite da terapêutica com anticorpo antagonista anti-CD40. Por "dose de carga" pretende-se indicar uma dose inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno que é administrada ao indivíduo, sendo que a dose administrada de anticorpo ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno se encontra na gama de dosagens mais elevada (i.e., de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg). A "dose de carga" pode ser administrada sob a forma de administração única, por exemplo, uma infusão única em que o anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno é administrado por via IV, ou em administrações múltiplas, por exemplo, infusões múltiplas em que o anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno é administrado por via IV, desde que a "dose de carga" completa seja administrada dentro de um período de cerca de 24 horas. Após a administração da "dose de carga", o indivíduo recebe então a administração de uma ou mais doses terapeuticamente eficazes adicionais do anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antígeno. As doses terapeuticamente eficazes subsequentes podem ser administradas, por exemplo, de acordo com um regime de dosagem semanal, ou uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas. Em tais formas de realização, as doses terapeuticamente eficazes subsequentes encontram-se geralmente na gama de dosagens mais baixa (i.e., 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg).

Alternativamente, em algumas formas de realização, após a "dose de carga", as doses terapeuticamente eficazes subsequentes do anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio são administradas de acordo com um "regime de manutenção", em que a dose terapeuticamente eficaz do anticorpo ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio é administrada uma vez por mês, uma vez a cada 6 semanas, uma vez a cada 2 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. Em tais formas de realização, as doses terapeuticamente eficazes do anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio encontram-se na gama de dosagens mais baixa (i.e., 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg), particularmente quando as doses subsequentes são administradas a intervalos mais frequentes, desde, por exemplo, uma vez a cada duas semanas até uma vez por mês, ou na gama de dosagens mais elevada (i.e., de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg), particularmente quando as doses subsequentes são administradas a intervalos menos frequentes, por exemplo, quando as doses subsequentes são administradas com um espaçamento entre si de cerca de um mês a cerca de 12 meses.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 presentes nas composições farmacêuticas aqui descritas e destinados a uso com os métodos aqui expostos poderão ser nativos ou obtidos por técnicas recombinantes, e poderão advir de qualquer fonte, incluindo fontes de mamíferos tais como, p.ex., ratinho, rato, coelho, primata, porco e humano. Preferencialmente, tais polipéptidos derivam de uma fonte humana, e mais

preferencialmente são proteínas humanas recombinantes derivadas de linhas celulares de hibridoma.

As composições farmacêuticas úteis na invenção compreendem variantes biologicamente activas dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção. Tais variantes retêm a actividade biológica desejada do polipéptido nativo, de tal modo que a composição farmacêutica que compreende o polipéptido variante possui o mesmo efeito terapêutico que a composição farmacêutica que compreende o polipéptido nativo quando administrada a um indivíduo. Isto é, o anticorpo variante anti-CD40 funciona como um componente terapeuticamente activo na composição farmacêutica de um modo semelhante ao observado com o anticorpo antagonista nativo, por exemplo CHIR-5.9 ou CHIR-12.12, expressos pelas linhas celulares de hibridoma 5.9 ou 12.12, respectivamente. Encontram-se disponíveis neste campo técnico diversos métodos para determinar se um anticorpo variante anti-CD40 retém a actividade biológica desejada e se, deste modo, pode servir como agente terapeuticamente activo na composição farmacêutica. A actividade biológica das variantes de anticorpos pode ser medida usando ensaios especificamente concebidos para a medição da actividade do anticorpo antagonista nativo, incluindo os ensaios aqui descritos.

Qualquer composição farmacêutica que compreenda um anticorpo antagonista anti-CD40 possuindo as características de ligação aqui descritas como componente terapeuticamente activo pode ser usada com os métodos aqui descritos. Assim, podem preparar-se composições líquidas, liofilizadas ou secas em spray compreendendo um ou mais anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção sob a forma de uma solução ou suspensão aquosa ou não aquosa para administração subsequente a um indivíduo de acordo com a invenção. Cada uma destas composições compreenderá pelo menos um dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da presente invenção como componente

terapeuticamente ou profilacticamente activo. Por "componente terapêuticamente ou profilacticamente activo" pretende-se indicar que o anticorpo anti-CD40 é especificamente incorporado na composição para produzir uma resposta terapêutica ou profiláctica desejada no que diz respeito ao tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou distúrbio num indivíduo quando a composição farmacêutica é administrada a esse indivíduo. De preferência, as composições farmacêuticas compreendem os apropriados agentes estabilizantes, agentes formadores de volume ou ambos, para minimizar os problemas associados à perda de estabilidade e de actividade biológica das proteínas durante a preparação e armazenagem.

Poderão adicionar-se agentes de formulação às composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo antagonista anti-CD40 da invenção. Estes agentes de formulação poderão incluir, de modo não limitativo, óleos, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sais, tampões, albumina, surfactantes ou agentes formadores de volume. Preferencialmente, os hidratos de carbono incluem açúcares ou açúcares alcoólicos como os mono-, di- ou polisacáridos, ou glucanos solúveis em água. Os sacáridos ou glucanos podem incluir frutose, glucose, manose, sorbose, xilose, maltose, sacarose, dextrano, pululano, dextrina, α e β -ciclodextrina, amido solúvel, hidroxietilamido e carboximetilcelulose, ou suas misturas. O termo "açúcar alcoólico" é definido como um hidrocarboneto C4 a C8 possuindo um grupo hidroxilo, e inclui galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol e arabitól. Estes açúcares ou açúcares alcoólicos podem ser usados individualmente ou em combinação. A concentração de açúcar ou açúcar alcoólico encontra-se entre 1,0% e 7% p/v, mais preferencialmente entre 2,0% e 6,0% p/v. De preferência, os aminoácidos incluem as formas levóginas (L) da carnitina,

arginina e betaína; no entanto, poderão adicionar-se outros aminoácidos. Os polímeros preferidos incluem polivinilpirrolidona (PVP) com um peso molecular médio entre 2.000 e 3.000, ou polietilenoglicol (PEG) com um peso molecular médio entre 3.000 e 5.000. Os surfactantes que podem ser adicionados à formulação são expostos nas EP nos. 270.799 e 268.110.

Adicionalmente, os anticorpos podem ser quimicamente modificados por conjugação covalente com um polímero para aumentar a sua semi-vida circulante, por exemplo. Os polímeros preferidos, e os métodos para os conjugar com péptidos, são expostos nas Patentes dos EUA Nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; e 4.609.546. Os polímeros preferidos são os polióis polioxietilados e o polietilenoglicol (PEG). O PEG é solúvel em água à temperatura ambiente e possui a fórmula geral de $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ em que R pode ser hidrogénio ou um grupo protector tal como um grupo alquilo ou alcanol. De preferência, o grupo protector possui entre 1 e 8 átomos de carbono, correspondendo mais preferencialmente a metilo. O símbolo n é um número inteiro positivo, preferencialmente entre 1 e 1.000, mais preferencialmente entre 2 e 500. O PEG possui um peso molecular médio preferido de entre 1.000 a 40.000, mais preferencialmente entre 2.000 e 20.000 e ainda mais preferencialmente entre 3.000 e 12.000. De preferência, o PEG possui pelo menos um grupo hidroxil, correspondendo este mais preferencialmente a um grupo hidroxil terminal. É este grupo hidroxil que é preferencialmente activado para reagir com um grupo amino livre do inibidor. No entanto, deve notar-se que o tipo e quantidade dos grupos reactivos pode fazer-se variar de modo a se obter um conjugado covalente de PEG/anticorpo da invenção.

Os polióis polioxietilados solúveis em água são também úteis para a presente invenção. Estes incluem sorbitol

polioxietilado, glucose polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), e semelhantes. É preferido o POG. Uma das razões para tal é a de que a estrutura principal de glicerol do glicerol polioxietilado é a mesma estrutura principal que ocorre naturalmente em, por exemplo, os mono-, di- e triglicéridos dos animais e dos seres humanos. Deste modo, esta ramificação não corresponderá necessariamente à introdução de um agente estranho no organismo. O POG possui um peso molecular preferido na mesma gama que o PEG. A estrutura do POG é apresentada em Knauf et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, e é encontrada uma exposição sobre conjugados de POG/IL-2 na Patente dos EUA N° 4.766.106.

Um outro sistema de administração de fármacos destinado a aumentar a semi-vida de circulação é o lipossoma. Os métodos de preparação dos sistemas de administração com lipossomas são expostos em Gabizon et al. (1982) Cancer Research 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; e Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. Existem outros sistemas de administração de fármacos bem conhecidos neste campo técnico que se encontram descritos em, p.ex., Poznansky et al. (1980) Drug Delivery Systems (R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) págs. 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277.

Os agentes de formulação a incorporar numa composição farmacêutica deverão proporcionar estabilidade ao anticorpo antagonista anti-CD40 ou ao seu fragmento de ligação ao antigénio. Isto é, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antigénio deverão reter a sua estabilidade física e/ou química e possuir a actividade biológica desejada, i.e., uma ou mais das actividades antagonistas aqui anteriormente definidas, incluindo, de modo não limitativo, a inibição da secreção de imunoglobulinas pelas células B periféricas humanas normais estimuladas por células T; inibição da sobrevivência e/ou proliferação das

células B periféricas humanas normais estimuladas por células T Jurkat; inibição da sobrevivência e/ou proliferação das células B periféricas humanas normais estimuladas por células que expressam CD40L ou pelo ligando de CD40 solúvel (sCD40L); inibição dos sinais intracelulares anti-apoptóticos de "sobrevivência" em qualquer célula estimulada por sCD40L ou por CD40L em fase sólida; inibição da transdução de sinal por CD40 em qualquer célula em consequência da ligação ao sCD40L ou ao CD40L em fase sólida; e inibição da proliferação de células B humanas malignas, tal como já referido em outro local desta descrição.

Os métodos para a monitorização da estabilidade das proteínas são bem conhecidos da técnica. Ver, por exemplo, Jones (1993) *Adv Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., New York, New York); e os ensaios de estabilidade abaixo descritos. Geralmente, a estabilidade da proteína é medida a uma temperatura escolhida durante um período especificado de tempo. Em formas de realização preferidas, uma formulação farmacêutica estável de anticorpos proporciona estabilidade ao anticorpo antagonista anti-CD40 ou ao seu fragmento de ligação ao antígeno quando armazenada à temperatura ambiente (a cerca de 25°C) durante pelo menos 1 mês, pelo menos três meses ou pelo menos 6 meses, e/ou é estável a cerca de 2-8°C durante pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses.

Uma proteína tal como um anticorpo, quando formulada numa composição farmacêutica, é considerada como retendo a sua estabilidade física num dado ponto de tempo se não evidenciar sinais visuais (i.e., descoloração ou perda de limpidez) ou sinais mensuráveis (por exemplo, usando a cromatografia de exclusão molecular (SEC) ou a dispersão da luz UV) de precipitação, agregação e/ou desnaturação naquela composição

farmacêutica. Em relação à estabilidade química, uma proteína tal como um anticorpo, quando formulada numa composição farmacêutica, é considerada como retendo a sua estabilidade química num dado ponto de tempo se as medições de estabilidade química forem indicativas de que a proteína (i.e., o anticorpo) retém a actividade biológica de interesse naquela composição farmacêutica. Os métodos para monitorização de alterações da estabilidade química são bem conhecidos da técnica e incluem, de modo não limitativo, métodos para a detecção de formas quimicamente alteradas da proteína como as que resultam de cortes de ligações, usando, por exemplo, SDS-PAGE, SEC e/ou espectrometria MALDI/TOF; e a degradação associada a alterações da carga molecular (por exemplo, associada à desamidação), usando, por exemplo, a cromatografia de troca iónica. Ver, por exemplo, os métodos abaixo expostos.

Um anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, quando formulado numa composição farmacêutica, é considerado como retendo uma actividade biológica desejada a um dado ponto de tempo se a actividade biológica desejada àquele tempo diferir em não mais do que cerca de 30%, preferencialmente em não mais do que cerca de 20% da actividade biológica desejada exibida na altura em que a composição farmacêutica foi preparada, tal como determinado por um ensaio adequado para a actividade biológica desejada. Os ensaios para a medição da actividade biológica desejada dos anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui apresentados, e dos seus fragmentos de ligação ao antigénio, podem ser efectuados tal como descrito nos Exemplos. Ver igualmente os ensaios descritos em Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Current

Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444; e as Patentes dos EUA Nos. 5.674.492 e 5.847.082.

Em algumas formas de realização desta invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, é formulado numa formulação farmacêutica líquida. O anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser preparado usando qualquer método conhecido neste campo, incluindo os métodos expostos acima. Em uma das formas de realização, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno é produzido por via recombinante numa linha celular CHO.

Após a sua preparação e purificação, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser formulado como uma formulação farmacêutica líquida do modo aqui exposto. Quando o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antígeno se destina a ser armazenado antes da sua formulação, este poderá ser congelado, por exemplo, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, sendo depois descongelado à temperatura ambiente para se proceder à formulação. A formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40 ou do seu fragmento de ligação ao antígeno. A quantidade de anticorpo ou do fragmento de ligação ao antígeno presente na formulação tem em consideração a via de administração e o volume de dose desejado.

Deste modo, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno numa concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de

50,0 mg/ml, cerca de 0,5 mg/ml a 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 formas de realização, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antígeno a uma 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 cerca de 45,0 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml. Em outras formas de realização, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antígeno numa 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 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 compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, e um tampão que mantém o pH da formulação dentro do intervalo de pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0, incluindo o pH de cerca de 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 dentro do intervalo de pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0. Em algumas formas de realização, o tampão mantém o pH da formulação no intervalo de pH de cerca de 5,0 a cerca de 6,5, cerca de 5,0 a cerca de 6,0, cerca de 5,0 a cerca de 5,5, cerca de 5,5 a cerca de 7,0, cerca de 5,5 a cerca de 6,5 ou cerca de 5,5 a cerca de 6,0.

Qualquer tampão adequado que mantenha o pH da formulação líquida de anticorpo anti-CD40 no intervalo de pH de cerca de 5,0 a cerca de 7,0 pode ser usado na formulação, desde que a estabilidade físico-química e a actividade biológica desejada do anticorpo sejam mantidas, tal como acima se fez notar. Os tampões adequados incluem, de modo não limitativo, ácidos convencionais e os seus sais, podendo o contra-íão corresponder a, por exemplo, sódio, potássio, amónio, cálcio ou magnésio. Os exemplos de ácidos convencionais e dos seus sais que podem ser usados para tamponar a formulação farmacêutica líquida incluem, de modo não limitativo, os tampões de ácido succínico ou succinato, ácido cítrico ou citrato, ácido acético ou acetato, ácido tartárico ou tartarato, ácido fosfórico ou fosfato, ácido glucónico ou gluconato, ácido glutâmico ou glutamato, ácido aspártico ou aspartato, ácido maleico ou maleato, e ácido málico ou malato. A concentração de tampão na formulação pode corresponder a 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 dentro do intervalo de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas formas de realização, a concentração de tampão na formulação está entre cerca de 5 mM e 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 dentro do intervalo de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM.

Em algumas formas de realização da invenção, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, e um tampão de succinato ou de citrato a uma concentração que mantém o pH da formulação no intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, preferencialmente de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5. Por

"tampão de succinato" ou "tampão de citrato" pretende-se indicar um tampão que compreende um sal de ácido succínico ou um sal de ácido cítrico, respectivamente. Numa forma de realização preferida, o contra-íão do succinato ou do citrato é o catião de sódio, e deste modo o tampão corresponde a succinato de sódio ou a citrato de sódio, respectivamente. No entanto, é de esperar que qualquer catião seja eficaz. Outros catiões possíveis para o succinato ou para o citrato incluem, de modo não limitativo, potássio, amónio, cálcio e magnésio. Tal como acima se fez notar, a concentração de tampão succinato ou citrato na formulação pode variar entre cerca de 1 mM e 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 dentro do intervalo de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas formas de realização, a concentração de tampão na formulação encontra-se no intervalo 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 formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml, ou de cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, e tampão de succinato ou de citrato, por exemplo, tampão de succinato de sódio ou de citrato de sódio, a uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, ou cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, preferencialmente cerca de 10 mM.

Nos casos em que é desejável que a formulação farmacêutica esteja perto da isotonicidade, a formulação farmacêutica líquida compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de

ligação ao antigénio, e um tampão para manter o pH da formulação no intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, poderá ainda conter uma porção de um agente isotonicizante que seja suficiente para tornar a formulação praticamente isotónica. Por "praticamente isotónica" pretende-se indicar que a formulação aquosa tem uma osmolaridade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360 mmol/kg, preferencialmente de cerca de 240 a cerca de 340 mmol/kg, mais preferencialmente de cerca de 250 a cerca de 330 mmol/kg, ainda mais preferencialmente de cerca de 260 a cerca de 320 mmol/kg, e mais preferencialmente ainda de cerca de 270 a cerca de 310 mmol/kg. Os métodos para a determinação da isotonicidade de uma solução são bem conhecidos dos peritos neste campo técnico. Ver, por exemplo, Setnikar et al. (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Os peritos na técnica conhecem diversos solutos farmacêuticamente aceitáveis que serão úteis para proporcionar isotonicidade a composições farmacêuticas. O agente isotonicizante poderá corresponder a qualquer reagente que tenha a capacidade de ajustar a pressão osmótica da formulação farmacêutica líquida da presente invenção até um valor que praticamente iguale ao de um fluido corporal. Deve utilizar-se um agente isotonicizante que seja fisiologicamente aceitável. Assim, a formulação farmacêutica líquida compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, e um tampão para manter o pH da formulação no intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, poderá ainda conter componentes destinados a proporcionar isotonicidade, por exemplo, cloreto de sódio; aminoácidos como alanina, valina e glicina; açúcares e açúcares alcoólicos (polióis), incluindo, de modo não limitativo, glucose, dextrose, frutose, sacarose, maltose, manitol, trealose, glicerol, sorbitol e xilitol; ácido

acético, outros ácidos orgânicos ou os seus sais, e quantidades relativamente pequenas de citratos ou fosfatos. O técnico de perícia média conhecerá ainda outros agentes adequados para proporcionar uma tonicidade óptima à formulação líquida.

Em algumas formas de realização preferidas, a formulação farmacêutica líquida compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, e um tampão para manter o pH da formulação no intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, compreende ainda cloreto de sódio como agente isotonicizante. A concentração de cloreto de sódio na formulação dependerá da contribuição dos outros componentes para a tonicidade. Em algumas formas de realização, a concentração de cloreto de sódio está entre cerca de 50 mM a 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 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. Numa destas formas de realização, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM. Em outras formas de realização semelhantes, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM, o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal

CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, e a formulação possui 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 formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, a 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 de citrato de sódio, a um pH de cerca de 5,5.

A degradação de proteínas devido ao ciclo de congelamento e descongelamento ou à fragmentação mecânica durante o processamento das formulações farmacêuticas líquidas desta invenção pode ser inibida pela incorporação de surfactantes na formulação de modo a reduzir a tensão superficial na interface solução-ar. Assim, em algumas formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, e ainda um surfactante. Em outras formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, um agente isotonicizante como o cloreto de sódio a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, e ainda um surfactante.

Os surfactantes típicos utilizados são os surfactantes não iónicos, incluindo os ésteres de polioxietileno-sorbitol tais

como o polisorbato 80 (Tween 80) e o polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno como o Pluronic F68; álcoois polioxietilénicos como o Brij 35; simeticone; polietilenoglicol, tal como PEG400; lisofosfatidilcolina; e polioxietileno-p-t-octilfenol, tal como Triton X-100. O processo clássico de estabilização de composições farmacêuticas através de surfactantes ou de emulsificantes está descrito em, p.ex., Levine et al. (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45(3):160-165. Um surfactante preferido utilizado na prática da presente invenção é o polisorbato 80. Quando a formulação inclui um surfactante, este é tipicamente adicionado numa quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (p/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 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%.

Assim, em algumas formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio; o tampão é o succinato de sódio ou o citrato de sódio a 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 possui 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 compreende ainda um surfactante, por exemplo, polisorbato 80, numa quantidade de cerca de 0,001% até cerca de 1,0% ou de cerca de 0,001% a cerca de 0,5%. Tais formulações poderão também opcionalmente incluir um agente

isotonicizante, tal como cloreto de sódio a 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 formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml, ou de cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, incluindo cerca de 20 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 citrato de sódio entre cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, incluindo cerca de 10 mM de succinato de sódio ou de citrato de sódio; cloreto de sódio a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, incluindo cerca de 150 mM; e opcionalmente um surfactante, por exemplo, polisorbato 80, numa quantidade de cerca de 0,001% até cerca de 1,0%, incluindo de cerca de 0,001% a cerca de 0,5%; sendo 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 a cerca de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0.

A formulação farmacêutica líquida poderá estar essencialmente isenta de conservantes e de outros veículos, excipientes ou estabilizantes tais como os acima referidos. Alternativamente, a formulação poderá conter um ou mais conservantes, por exemplo, agentes antibacterianos, veículos farmaceuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes como os acima descritos, desde que estes não afetem adversamente a estabilidade fisico-química do anticorpo antagonista anti-CD40 ou do seu fragmento de ligação ao antigénio. Os exemplos de veículos, excipientes e estabilizantes adequados incluem, de modo não limitativo, agentes tamponantes adicionais, co-solventes, surfactantes,

antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina, agentes quelantes como o EDTA, complexos metálicos (por exemplo, complexos de Zn-proteína), e polímeros biodegradáveis tais como poliésteres. Pode encontrar-se uma exposição aprofundada sobre a formulação e selecção de veículos, estabilizantes e isomólitos farmacêuticamente aceitáveis em Remington's Pharmaceutical Sciences (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990).

Após a preparação da formulação farmacêutica líquida ou de outra composição farmacêutica tal como aqui descrito, esta pode ser liofilizada para evitar a degração. Os métodos para a liofilização de composições líquidas são bem conhecidos dos técnicos de perícia média. Imediatamente antes do uso, a composição poderá ser reconstituída com um diluente estéril (solução de Ringer, água destilada ou soro fisiológico estéril, por exemplo) que poderá incluir ingredientes adicionais. Após a reconstituição, a composição é preferencialmente administrada aos indivíduos utilizando os métodos já conhecidos dos peritos neste campo técnico.

Uso de Anticorpos Antagonistas Anti-CD40 no Fabrico de Medicamentos

A presente exposição proporciona igualmente o uso de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao antigénio no fabrico de um medicamento que se destina ao tratamento da doença auto-imune e/ou inflamatória num indivíduo, sendo o medicamento coordenado com o tratamento com pelo menos uma outra terapêutica. Por "coordenado" pretende-se indicar que o medicamento se destina a ser usado antes de, durante, ou após o tratamento do indivíduo com pelo menos uma outra terapêutica. Os exemplos de outras terapêuticas incluem, de modo não limitativo, as acima descritas, i.e., cirurgia ou procedimentos cirúrgicos (p.ex.

esplenectomia, linfadenectomia, tireoidectomia, plasmaferese, leucoferese, transplante de células, tecidos ou órgãos, perfusão de órgãos, procedimentos de intervenção intestinal e semelhantes), radioterapia, terapêuticas como a terapêutica com esteróides e terapêutica não-esteróide, terapêutica hormonal, terapêutica com citocinas, terapêutica com agentes dermatológicos (por exemplo, agentes tópicos usados para tratar alterações da pele tais como alergias, dermatite de contacto e psoríase), terapêutica imunossupressora, outras terapêuticas anti-inflamatórias com anticorpos monoclonais e semelhantes, sendo que o tratamento com a terapêutica adicional, ou com as terapêuticas adicionais, ocorre antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antigénio, tal como acima referido. Numa tal forma de realização, a presente invenção proporciona o uso do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, no fabrico de um medicamento para o tratamento da doença auto-imune e/ou inflamatória num indivíduo, em que o medicamento é coordenado com o tratamento com pelo menos uma outra terapêutica, como acima referido.

Em algumas formas de realização, o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, aqui referidos, ou um seu fragmento de ligação ao antigénio, é coordenado com duas outras terapêuticas. Quando o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40 é coordenado com duas outras terapêuticas, o medicamento pode ser usado antes, durante ou após o tratamento do indivíduo com qualquer uma das outras terapêuticas, ou com ambas.

A invenção proporciona igualmente o uso de um anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 aqui expostos, ou um seu fragmento de

ligação ao antigénio, no fabrico de um medicamento para o tratamento da doença auto-imune e/ou inflamatória num indivíduo, em que o medicamento é usado num indivíduo que já foi pré-tratado com pelo menos uma outra terapêutica. Os termos "pré-tratado" ou "pré-tratamento" incluem indivíduos que foram tratados com uma ou mais de outras terapêuticas antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, ou o seu fragmento de ligação ao antigénio. Por "pré-tratado" ou "pré-tratamento" incluem indivíduos que foram tratados com outra terapêutica ou outras terapêuticas no espaço de 2 anos, 18 meses, 1 ano, 6 meses, 2 meses, 6 semanas, 1 mês, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 6 dias, 5 dias, 4 dias, 3 dias, 2 dias, ou até um dia antes da iniciação do tratamento com o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 aqui descrito ou um seu fragmento de ligação ao antigénio. Não é necessário que o indivíduo tenha respondido ao pré-tratamento com a terapêutica ou terapêuticas anteriores. Assim, o indivíduo que recebe o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antigénio poderá ter respondido ou poderá não ter respondido ao pré-tratamento com a terapêutica anterior, ou a uma ou mais das terapêuticas anteriores quando o pré-tratamento compreende terapêuticas múltiplas.

Os exemplos que se seguem são apresentados com fins ilustrativos e não com o intuito de limitar a invenção.

EXPERIMENTAÇÃO

Introdução

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 usados nos Exemplos abaixo são os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Os anticorpos

anti-CD40 CHIR-5.9 e CHIR-12.12 são anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD40 humano do subtipo IgG₁ humano, gerados por imunização de ratinhos transgênicos portadores do locus de cadeia pesada de IgG₁ humana e do locus de cadeia leve κ humana (tecnologia Xenomouse®; Abgenix; Fremont, California). Usaram-se como imunogénio células de insecto SF9 expressando o domínio extracelular de CD40.

Resumidamente, fundiram-se esplenócitos de ratinhos imunizados com células de mieloma murino SP 2/0 ou P 3 x 63Ag8.653 a uma razão de 10:1 usando polietilenoglicol a 50% tal como previamente descrito por de Boer et al. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. As células fundidas foram ressuspensas em meio IMDM completo suplementado com hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM) e hIL-6 a 0,5 ng/ml (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). As células fundidas foram então distribuídas entre os poços de placas de cultura de tecidos com 96 poços, de modo a que cada poço contivesse em média um hibridoma em desenvolvimento.

Após 10-14 dias, os sobrenadantes das populações de hibridoma foram rastreados quanto à produção de anticorpos específicos. Para o rastreio da produção de anticorpos específicos pelos clones de hibridoma, os sobrenadantes de cada poço foram reunidos num pool e inicialmente testados por ELISA quanto à especificidade da actividade anti-CD40. Os positivos foram então usados para a marcação por fluorescência das células B transformadas por EBV usando um ensaio padronizado de FACS. As células de hibridoma positivas foram clonadas duas vezes por diluição limitante em IMDM/FBS contendo hIL-6 a 0,5 ng/ml.

Fundiram-se um total de 31 baços de ratinho com as células de mieloma de ratinho SP2/0 para gerar 895 anticorpos que reconhecem o CD40 recombinante em ensaios ELISA. Em média, aproximadamente 10% dos hibridomas produzidos usando a

tecnologia XenoMouse® da Abgenix (Abgenix,; Freemont, Califórnia) poderão conter cadeia leve lambda de ratinho em vez de cadeia kappa humana. Os anticorpos contendo cadeia leve lambda de ratinho foram seleccionados e eliminados. Um subconjunto de 260 anticorpos que evidenciou igualmente a ligação ao CD40 da superfície celular foram seleccionados para análise mais completa. Os hibridomas estáveis seleccionados durante uma série de procedimentos de subclonagem foram usados para caracterização mais detalhada através de ensaios de ligação e funcionais.

Os clones de 7 outros hibridomas foram identificados como possuindo actividade antagonista. Com base na sua potência antagonista relativa e nas actividades ADCC, foram seleccionados dois clones de hibridoma para avaliação posterior (Tabela 1, abaixo). Estes clones são designados por 131.2F8.5.9 (5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).

Tabela 1. Resumo do conjunto inicial de dados obtidos com os anticorpos IgG1 anti-CD40 5.9 e CHIR-12.12

Hibridoma progenitor	Clones de hibridoma	Ligação à superfície celular	Antagonista	ADCC	CDC	CMCC#	Sequência de DNA da região V
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Sim
153.8E2	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	Sim

A linha de hibridoma de ratinho 131.2F8.5.9 (CMCC#12047) e a linha de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC#12056) foram depositadas na American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] sob os Números de Depósito Patenteado PTA-5542 e PTA-5543, respectivamente.

Os cDNAs codificando para as regiões variáveis dos anticorpos candidatos foram amplificados por PCR, clonados e sequenciados. As sequências de aminoácidos para a cadeia leve e para a cadeia pesada do anticorpo CHIR-12.12 são apresentadas nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. Ver também a SEQ ID NO:2 (cadeia leve para o mAc CHIR-12.12) e a SEQ ID NO:4 (cadeia pesada para o mAc 12.12). É apresentada na Figura 1B uma variante para a cadeia pesada do mAc CHIR-12.12 (ver também a SEQ ID NO:5), que difere da SEQ ID NO:4 no facto de possuir um resíduo de serina a substituir o resíduo de alanina da posição 153 da SEQ ID NO:4. As sequências de nucleótidos codificando para a cadeia leve e para a cadeia pesada do anticorpo CHIR-12.12 são apresentadas nas Figuras 2A e 2B, respectivamente. Ver também a SEQ ID NO:1 (sequência codificante para a cadeia leve para o mAc CHIR-12.12) e a SEQ ID NO:3 (sequência codificante para a cadeia pesada do mAc CHIR-12.12). As sequências de aminoácidos para a cadeia leve e para a cadeia pesada do anticorpo CHIR-5.9 são apresentadas nas Figuras 3A e 3B, respectivamente. Ver também a SEQ ID NO:6 (cadeia leve para o mAc CHIR-5.9) e a SEQ ID NO:7 (cadeia pesada para o mAc CHIR-5.9). É apresentada na Figura 3B uma variante para a cadeia pesada do mAc CHIR-5.9 (ver também a SEQ ID NO:8), que difere da SEQ ID NO:7 no facto de possuir um resíduo de serina a substituir o resíduo de alanina na posição 158 da SEQ ID NO:7.

Tal como esperado para os anticorpos que derivam de hibridomas independentes, existe uma variação substancial nas sequências de nucleótidos das regiões determinantes da complementaridade (CDRs). Crê-se que a diversidade na região CDR3 de V_H seja a que mais significativamente determina a especificidade do anticorpo.

Tal como evidenciado por análise FACS, os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 ligam-se especificamente ao CD40 humano e

podem evitar a ligação do ligando de CD40. Ambos os mAbs podem competir com o ligando de CD40 pré-ligado ao CD40 da superfície celular. A afinidade de ligação de CHIR-5.9 ao CD40 humano é de $1,2 \times 10^{-8}$ M e a afinidade de ligação de CHIR-12.12 ao CD40 humano é de 5×10^{-10} M.

Os anticorpos monoclonais CHIR-12.12 e CHIR-5.9 são ambos antagonistas fortes e inibem *in vitro* a proliferação, mediada pelo ligando de CD40, das células B normais.

Exemplo 1: CHIR-12.12 Bloqueia a Sinalização Celular Mediada por CD40L

O ligando de CD40 solúvel (CD40L) activa as células B e induz vários aspectos das respostas funcionais, incluindo o aumento da sobrevivência e da proliferação e a activação das vias de sinalização de NF κ B, ERK/MAPK, PI3K/Akt e p38. Adicionalmente, a estimulação de CD40 mediada por CD40L proporciona sinais de sobrevivência através da redução da clivagem de PARP e da indução das proteínas anti-apoptóticas, XIAP e Mcl-1, em células B normais. A estimulação de CD40 mediada por CD40L recruta igualmente TRAF2 e TRAF3 para a ligação ao domínio citoplasmático de CD40.

Os estudos que se seguem demonstram que CHIR-12.12 inibiu directamente todos estes efeitos de estimulação em células B humanas normais. Por exemplo, o tratamento com CHIR-12.12 resultou no aumento da clivagem de caspase-9, caspase-3 e PARP, assim como na redução de XIAP e de Mcl-1 de um modo dependente do tempo e da dose, restabelecendo a apoptose das células B. O tratamento com CHIR-12.12 inibiu também a fosforilação da quinase I κ B (IKK) α e β (via de NF κ B), ERK, Akt e p38 em resposta à estimulação de CD40 mediada por CD40L. Adicionalmente, verificou-se que CHIR-12.12 não desencadeava estes efeitos apoptóticos sem uma estimulação inicial de CD40 mediada por CD40L.

CHIR-12.12 inibiu a sobrevivência mediada pelo ligando de CD40 através da indução da clivagem de PARP.

Nestas experiências, $0,6 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Foram então adicionados CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de controlo. As células foram colhidas aos 0, 20 minutos, 2 horas, 6 horas, 18 horas e 26 horas. Detectou-se caspase-9 clivada, caspase-3 clivada, PARP clivada e controlos de β-actina por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, observou-se que a estimulação de CD40 mediada por CD40L proporcionou sinais de sobrevivência, uma vez que não resultou no aumento dos níveis de caspase-9 clivada, caspase-3 clivada ou PARP clivada ao longo do tempo, o que indica que as células não estavam a sofrer apoptose. No entanto, o tratamento com CHIR-12.12 resultou num aumento destes produtos de clivagem, indicando que o tratamento com CHIR-12.12 anulou os efeitos da ligação do ligando de CD40 sobre a sinalização de sobrevivência em células B normais estimuladas por sCD40L, restabelecendo a apoptose de células B (dados não apresentados).

CHIR-12.12 inibiu a expressão de proteínas anti-apoptóticas "de sobrevivência".

Nestas experiências, $0,6 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Foram então adicionados CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de controlo. As células foram colhidas aos 0, 20 minutos, 2 horas, 6 horas, 18 horas e 26 horas. Detectou-se Mcl-1, XIAP, CD40 e controlos de β-actina por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, a estimulação por sCD40L resultou numa expressão mantida de Mcl-1 e de XIAP ao longo do tempo. No entanto, o tratamento das células estimuladas por sCD40L com CHIR-12.12 resultou numa diminuição da expressão destas proteínas ao longo do tempo (dados não apresentados). Uma vez que Mcl-1 e XIAP constituem sinais "de sobrevivência" capazes de bloquear a via apoptótica, estes resultados demonstram que o tratamento com CHIR-12.12 remove o bloqueio contra a apoptose em células B normais estimuladas por sCD40L.

O tratamento com CHIR-12.12 inibiu a fosforilação de IKK α (Ser180) e de IKK β (Ser 181) em células B normais.

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com $1 \mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Foram então adicionados CHIR-12.12 ($10 \mu\text{g/ml}$) e IgG de controlo. As células foram colhidas aos 0 e aos 20 minutos. Detectou-se IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) fosforilados e controlos de IKK β total por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, a estimulação por sCD40L resultou na fosforilação de IKK α (Ser 180) e de IKK β (Ser 181) ao longo do tempo; no entanto, o tratamento com CHIR-12.12 anulou esta resposta à estimulação por sCD40L em células B normais (dados não apresentados).

O tratamento com CHIR-12.12 inibiu a sobrevivência mediada pelo ligando de CD40 num modo dependente da dose.

Nestas experiências, $0,6 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com $1 \mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Foram então adicionados CHIR-12.12

(0,01, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 µg/ml) e IgG de controlo. As células foram colhidas às 24 horas. Detectou-se PARP clivada e controlos de β -actina por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, o tratamento com CHIR-12.12 resultou num aumento da clivagem de PARP em células estimuladas por sCD40L de um modo dependente da dose, anulando deste modo a via de sinalização de sobrevivência em células B normais estimuladas por sCD40L (dados não apresentados).

CHIR-12.12 inibiu a expressão de proteínas anti-apoptóticas "de sobrevivência" num modo dependente da dose.

Nestas experiências, $0,6 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, uK). Foram então adicionados CHIR-12.12 (0,5, 2 e 10 µg/ml) e IgG de controlo. As células foram colhidas às 22 horas. Detectou-se Mcl-1, XIAP, PARP clivada e controlos de β -actina por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, o tratamento com CHIR-12.12 reduziu a expressão de Mcl-1 e XIAP e aumentou a expressão de PARP clivada em células estimuladas por sCD40L de um modo dependente da dose, anulando assim estes bloqueios à via apoptótica em células B normais estimuladas por sCD40L (dados não apresentados).

CHIR-12.12 não afectou a expressão de proteínas anti-apoptóticas, PARP clivada e XIAP na ausência de sinalização com CD40L solúvel.

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram tratadas apenas com CHIR-12.12 (10 µg/ml) e IgG de controlo (i.e., as células não foram pré-estimuladas com

sCD40L antes da adição de anticorpo). As células foram colhidas às 0, 4, 14 e 16 horas. Detectou-se XIAP, PARP clivada e controles de β -actina por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, os resultados mostram que, sem a estimulação por sCD40L, as células expressaram concentrações aumentadas de PARP clivada enquanto que a expressão de XIAP permaneceu constante, tanto nas células tratadas com a IgG de controlo como nas tratadas com CHIR-12.12 (dados não apresentados). Estes dados indicam que CHIR-12.12 não desencadeia a apoptose em células B humanas normais sem estimulação por CD40L.

CHIR-12.12 inibe a fosforilação de IKK α (Ser 180) e IKK β (Ser 181), Akt, ERK e p38 em células B normais.

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram colocadas em privação de soro em meio contendo 1% de FBS e foram estimuladas com 1 μ g/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). As culturas foram tratadas com CHIR-12.12 (1 e 10 μ g/ml) e IgG de controlo. As células foram colhidas aos 0 e aos 20 minutos. Detectou-se fosfo-IKK α , fosfo-IKK β , IKK β total, fosfoERK, ERK total, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-p38 e p38 total por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, a estimulação por sCD40L resultou no incremento da fosforilação de IKK α/β , da fosforilação de ERK, da fosforilação de Akt e da fosforilação de p38, deste modo conduzindo à sobrevivência e/ou proliferação das células. O tratamento das células com CHIR-12.12 anulou os efeitos da estimulação por sCD40L sobre estas vias de sinalização em células B normais (dados não apresentados).

CHIR-12.12 inibe as vias de sinalização múltipla, tais como as vias de PI3K e MEK/ERK, na cascata de sinalização de CD40.

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram colocadas em privação de soro em meio contendo 1% de FBS e foram estimuladas com 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). As culturas foram também tratadas com CHIR-12.12 (1 e 10 µg/ml), Wortmanin (um inibidor de PI3K/Akt, 1 e 10 µM), LY 294002 (um inibidor de PI3K/Akt, 10 e 30 µM) e PD 98095 (um inibidor de MEK, 10 e 30 µg/ml). As células foram colhidas aos 0 e aos 20 minutos. Detectou-se fosfoERK, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-IKKα/β, e total por Western Blot nos lisados celulares.

Abreviadamente, os resultados mostram que a estimulação com CHIR-12.12 anulou a fosforilação de todas estas moléculas de transdução de sinal, enquanto que os inibidores da transdução de sinal exibiram apenas uma anulação específica da sinalização, indicando que a inibição por CHIR-12-12 se exerce provavelmente a montante destas moléculas de transdução de sinal mediadas pela estimulação por CD40L (dados não apresentados).

CHIR-12.12 inibe a ligação das moléculas de sinalização TRAF2 e TRAF3 ao domínio citoplasmático de CD40 em células B normais.

Nestas experiências, $4,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram colocadas em privação de soro durante 4 horas em meio contendo 1% de FBS e foram estimuladas com 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK) durante 20 minutos. As células foram colhidas aos 0 e aos 20 minutos. O CD40 foi imunoprecipitado usando anti-CD40 policlonal (Santa

Cruz Biotechnology, CA), e foi sondado num Western Blot com mAc anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), mAc anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, CA) e mAc anti-CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA).

Abreviadamente, os resultados mostram que TRAF2 e TRAF3 co-precipitaram com CD40 após a estimulação por sCD40L. Por contraste, o tratamento com CHIR-12.12 anulou a formação do complexo de sinalização CD40-TRAF2/3 em células B normais estimuladas por sCD40L. Não ocorreram alterações da expressão de CD40 (dados não apresentados).

Sem que se pretenda uma limitação a qualquer teoria, os resultados destas experiências, e os resultados nos exemplos acima expostos, indicam que o anticorpo CHIR-12.12 é um anticorpo monoclonal antagonista anti-CD40 de dupla acção que possui uma combinação única de atributos. Este anticorpo monoclonal inteiramente humano bloqueia as vias de sinalização por CD40 mediadas por CD40L dirigidas à sobrevivência e proliferação de células B; este antagonismo conduz em última instância à morte celular. CHIR-12.12 medeia igualmente o reconhecimento e a ligação pelas células efectoras, iniciando a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Uma vez estabelecida a ligação entre CHIR-12.12 e as células efectoras, são libertadas enzimas citolíticas, conduzindo à apoptose e lise das células B. CHIR-12.12 evidenciou-se como um anticorpo antitumoral mais potente do que o rituximab nas comparações efectuadas em modelos tumorais pré-clínicos.

Exemplo 2: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 Ligam-se a um Epitopo no CD40 que é Diferente do de 15B8

Os anticorpos monoclonais candidatos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 competem entre si para a ligação ao CD40 mas não competem com 15B8, um mAc IgG2 anti-CD40 (ver Publicação Internacional N° WO 02/28904). Foram concebidos estudos de ligação competitiva

de anticorpos usando Biacore que utilizam chips biosensores CM5 com proteína A imobilizada através de acoplamento por amina, tendo a proteína A imobilizada sido usada para capturar os anticorpos anti-CD40, CHIR-12.12 ou 15B8. Observaram-se curvas normais de associação/dissociação com concentrações variáveis de CD40-his (dados não apresentados). Para os estudos de competição, capturou-se CHIR-12.12 ou 15B8 à superfície da proteína A. Subsequentemente foi passado um fluxo do complexo Fab CD40-his/CHIR-5.9 (100 nM CD40:1 μ M Fab de CHIR-5.9), a concentrações variáveis, sobre a superfície modificada. No caso de CHIR-12.12, não se observou a associação do complexo, o que indica que CHIR-5.9 bloqueia a ligação de CHIR-12.12 ao CD40-his. Com o anticorpo 15B8, observou-se a associação do complexo Fab de CHIR-5.9, o que indica que o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 não bloqueia a ligação de 15B8 ao local de ligação no CD40. No entanto, a taxa de deslocamento do complexo aumentou de forma muito marcada (dados não apresentados).

Foi igualmente determinado que os anticorpos 15B8 e CHIR-12.12 não competem para a ligação ao CD40-his. Esta experiência foi efectuada capturando o anticorpo CHIR-12.12 sobre o chip biosensor com proteína A, bloqueando os locais de ligação residuais da proteína A com hIgG₁ de controlo, promovendo a ligação com CD40-his e seguidamente fazendo passar um fluxo de 15B8 sobre a superfície modificada. O anticorpo 15B8 ligou-se sob estas condições, o que indica que CHIR-12.12 não bloqueia a ligação de 15B8 ao CD40.

Exemplo 3: Propriedades de Ligação dos mAbs CHIR-12.12 e 5.9

A proteína A foi imobilizada sobre os chips biosensores CM5 através de acoplamento por amina. Os anticorpos monoclonais humanos anti-CD40, a 1,5 μ g/ml, foram capturados à superfície modificada do biosensor durante 1,5 minutos a 10

$\mu\text{l}/\text{min}$. Fez-se passar um fluxo de CD40-his recombinante solúvel sobre a superfície do biosensor a diversas concentrações. O anticorpo e o antígeno foram diluídos em HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% Surfactante P20 (HBS-EP). Foram determinadas as constantes cinéticas e de afinidade usando o software Bioevaluation com um modelo de interação/ajuste global de 1:1.

Tal como mostra a Tabela 2, abaixo, existe uma diferença de 121 vezes entre a taxa de deslocamento de 5.9 e a de CHIR-12.12, resultando numa afinidade 24 vezes superior do anticorpo CHIR-12.12.

Tabela 2. Resumo das propriedades de ligação dos anticorpos anti-CD40 CHIR-5.9 e CHIR-12.12.

Anticorpo	$K_a (\text{M}^{-1} \text{ seg}^{-1})$	$k_d (\text{seg}^{-1})$	KD (nM)
Anti-CD40, 5.9	$(12,35 \pm 0,64) \times 10^5$	$(15,0 \pm 1,3) \times 10^{-3}$	$12,15 \pm 0,35$
Anti-CD40, CHIR-12.12	$(2,41 \pm 0,13) \times 10^5$	$(1,24 \pm 0,06) \times 10^{-4}$	$0,51 \pm 0,02$

Exemplo 4: Caracterização do Epitopo para os Anticorpos Monoclonais CHIR-12.12 e CHIR-5.9

Para determinar a localização do epitopo de CD40 que é reconhecido pelos anticorpos monoclonais CHIR-12.12 e CHIR-5.9, foram realizadas análises por SDS-PAGE e Western Blot. Usou-se CD40 purificado (0,5 μg) que foi separado num gel NUPAGE a 4-12% sob condições redutoras e não redutoras, transferido para membranas de PVDF e sondado com anticorpos monoclonais à concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Os blots foram sondados com IgG anti-humana conjugada com fosfatase alcalina e

desenvolvidos usando o substrato estabilizado para a fosfatase alcalina Western Blue® (Promega).

Os resultados indicam que o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 reconhece epitopos tanto na forma reduzida como na forma não reduzida de CD40, sendo que a forma não reduzida de CD40 exibe uma maior intensidade do que a forma reduzida de CD40 (Tabela 3; blots não apresentados). O facto de o reconhecimento ser positivo para ambas as formas de CD40 indica que este anticorpo interage com um epitopo conformacional do qual uma parte corresponde a uma sequência linear. O anticorpo monoclonal CHIR-5.9 reconhece principalmente a forma não reduzida de CD40, sugerindo que este anticorpo interage com um epitopo principalmente conformacional (Tabela 3; blots não apresentados).

Tabela 3. Identificação de domínios.

	Domínio 1	Domínio 2	Domínio 3	Domínio 4
Mac CHIR.12.12	-	+	-	-
Mac CHIR-5.9	-	+	-	-
Mac 15B8	+	-	-	-

Para mapear a região antigénica de CD40, os quatro domínios extracelulares de CD40 foram clonados e expressos em células de insecto sob a forma de proteínas de fusão com GST. A secreção dos quatro domínios foi assegurada com um sinal de secreção de GP67. O sobrenadante das células de insecto foi analisado por SDS-PAGE e Western Blot para identificar o domínio que continha o epitopo.

O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 reconhece um epitopo no Domínio 2 tanto em condições redutoras como em condições não redutoras (Tabela 4; blots não apresentados). Por contraste, o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 exibe um reconhecimento muito fraco do Domínio 2 (Tabela 4; blots não apresentados). Nenhum

destes anticorpos reconheceu os Domínios 1, 3 ou 4 nesta análise.

Tabela 4. Análise do Domínio 2.

	reductoras	não reductoras
mAc CHIR.12.12	++	+++
mAc CHIR-5.9	+	+

Para definir com maior precisão o epítipo reconhecido pelo mAc CHIR-12.12, sintetizaram-se péptidos do Domínio Extracelular 2 de CD40, que corresponde à sequência PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQGTSETDTICT (resíduos 61-104 da sequência apresentada em SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12). Foram geradas membranas SPOTs (Sigma) contendo trinta e cinco péptidos 10meros com um offset de 1 aminoácido. Foi efectuada uma análise por Western Blot com mAc CHIR-12.12 e beta-galactosidase-IgG anti-humana como anticorpo secundário. Procedeu-se ao stripping do blot e este foi re-sondado com mAc CHIR-5.9 para determinar a região reconhecida por este anticorpo.

Na análise de SPOTs, a sondagem com o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 a 10 µg/ml forneceu reacções positivas nos spots 18 a 22. A região de sequência abrangida por estes péptidos é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado da sondagem com o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 na análise de SPOTs.

Mancha número	Região de Sequência
18	HQHK YCDPNL (resíduos 78-87 da SEQ ID NO:10 ou 12)
19	QHK YCDPNLG (resíduos 79-88 da SEQ ID NO: 10 ou 12)
20	HK YCDPNLGL (resíduos 80-89 da SEQ ID NO:10 ou 12)
21	K YCDPNLGLR (resíduos 81-90 da SEQ ID NO:10 ou 12)
22	YCDPNLGLRV (resíduos 82-91 da SEQ ID NO:10 ou 12)

Estes resultados correspondem a um epitopo linear de: YCDPNL (resíduos 82-87 da sequência apresentada em SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12). Este epitopo contém Y82, D84 e N86, previstos como estando envolvidos na interação CD40-ligando de CD40.

A análise de SPOTs com o mAc CHIR-5.9 evidenciou um fraco reconhecimento dos péptidos representados pelas manchas 20-22 e mostrados na Tabela 6, sugerindo o envolvimento da região YCDPNLGL (resíduos 82-89 da sequência apresentada em SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12) na sua ligação ao CD40. Deve notar-se que os mAcS CHIR-12.12 e CHIR-5.9 competem entre si para a ligação ao CD40 na análise de BIACORE.

Tabela 6. Resultados da sondagem com o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-5.9 na análise de SPOTs.

Mancha número	Região de Sequência
20	HK YCDPNLGL (resíduos 80-89 da SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12)
21	K YCDPNLGLR (resíduos 81-90 da SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12)
22	YCDPNLGLRV (resíduos 82-91 da SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12)

Os epitopos lineares identificados pelas análises de SPOTs encontram-se no módulo B1 de CD40. A sequência do módulo B1 de CD40 é:

HKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTIC (resíduos 80-103 da SEQ ID NO:10 ou da SEQ ID NO:12).

No interior do epitopo linear identificado para CHIR-12.12 encontra-se C83. Sabe-se que este resíduo de cisteína forma uma ligação dissulfito com C103. É provável que o epitopo conformacional do mAc CHIR-12.12 contenha esta ligação dissulfito (C83-C103) e/ou os aminoácidos circundantes que se encontram conformacionalmente perto de C103.

Exemplo 5: Testes em Modelos de Doenças Autoimunes e Inflamatórias

Modelo de Lúpus Eritematoso Sistémico (LES).

O anticorpo CHIR-12.12 é testado num modelo humano de lúpus eritematoso sistémico (LES) em que as células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) de pacientes com LES são enxertadas em ratinhos SCID. Ver, por exemplo, o modelo descrito em Duchosal et al. (1990) J. Exp. Med. 172:985-8.

Após a transferência de CMSPs de pacientes com LES para ratinhos SCID, é determinado se o tratamento com CHIR-12.12 influencia ou não a resposta dos linfócitos T ao auto-antigénio, a produção de auto-anticorpos e as manifestações da doença, tal como a glomerulonefrite. O primeiro conjunto de estudos testou CHIR-12.12 como agente único, seguindo-se o teste do efeito em combinação com outros agentes como o CTLA4-Ig.

Modelo de esclerose múltipla.

O modelo experimental de encefalite autoimune (EAE) no macaco titi constitui um modelo para a esclerose múltipla humana. Ver, por exemplo, o modelo descrito em Raine et al. (1999) Ann. Neurol. 46:144-60 e Hart et al. (2004) Lancet Neurol. 3:588-97. O anticorpo CHIR-1.2.12 liga-se ao CD40 do macaco titi e é testado quanto à sua eficácia neste modelo.

Inflamação e aterosclerose.

O anticorpo CHIR-12.12 é testado *in vitro* quanto à capacidade para inibir os efeitos, induzidos por CD40L, de produção de enzimas de degradação da matriz, expressão de factores tecidulares e de citocinas proinflamatórias e regulação positiva de moléculas de adesão. Os estudos

subsequentes testam a capacidade do anticorpo CHIR-12.12 para manifestar actividades anti-inflamatórias *in vivo* usando ratinhos transgénicos que expressam a molécula de CD40 humano. Ver, por exemplo, o modelo descrito em Yasui (2002) *Int. Immunol.* 14:319-29.

Transplante.

O anticorpo CHIR-12.12 é testado quanto à sua capacidade para evitar a rejeição de um transplante em modelos de primatas não-humanos. Trataram-se com anticorpo CHIR-12.12 macacos cinomolgos receptores de um aloenxerto renal para demonstrar o seu efeito sobre a aceitação do enxerto, com ou sem fármacos imunossuppressores adicionais como a ciclosporina, FK506, rapamicina, corticosteróides, CTLA4-Ig, anticorpo anti-Estimulador dos Linfócitos B e semelhantes. Ver o modelo descrito em Wee et al. (1992) *Transplantation* 53:501-7.

Doença de Alzheimer.

O anticorpo CHIR-12.12 é primeiramente testado *in vitro* quanto à sua capacidade para bloquear a activação microglial. Os estudos de eficácia *in vivo* com CHIR-12.12 são efectuados em ratinhos duplamente transgénicos que expressam CD40 humano e sobreexpressam péptido beta-amilóide. Ver, por exemplo, o modelo descrito em Tan et al. (2002) *Nat. Neurosci.* 5:1288-93.

Exemplo 6: Estudos Clínicos com CHIR-5.9 e CHIR-12.12

Objectivos Clínicos

O objectivo global é o de proporcionar uma terapêutica eficaz para a artrite reumatóide (AR) através do direccionamento contra estas células cancerosas de um anticorpo IgG1 anti-CD40. O sinal para esta doença é determinado na fase II, se bem que algumas medidas de

actividade possam ser obtidas na fase I. Inicialmente o agente é estudado como agente único, mas será combinado com outros agentes terapêuticos à medida que prossegue o desenvolvimento.

Fase I

- Avaliação da segurança e da farmacocinética - escalamento da dose em indivíduos com AR.
- Escolha de doses baseada na segurança, tolerabilidade e alteração nos marcadores séricos de CD40. Em geral é procurada uma MTD, mas poderá ser adequado reunir outras indicações de eficácia (depleção em células CD40+, etc.) para o estabelecimento da dose.
- Consideração do uso de mais do que uma dose, já que poderá ser necessário proceder a algum estabelecimento de dose na fase II. A dosagem para os pacientes é estabelecida semanalmente através de amostragem farmacocinética em tempo real (Pk). Inicialmente, um ciclo de 4 semanas corresponde à dosagem máxima permitida. A Pk poderá ser altamente variável, dependendo estado da doença, da densidade de CD40, etc.
- Este(s) ensaio(s) é(são) aberto(s) a indivíduos com AR.
- A decisão de descontinuar ou continuar os estudos baseia-se na segurança, na dose e nas indicações preliminares de actividade terapêutica.
- A actividade do fármaco, determinada através da taxa de resposta, é determinada na Fase II.
- Identificar a(s) dose(s) para a Fase II.

Fase II

Serão iniciados diversos ensaios clínicos em indivíduos com AR. Mais do que uma dose, e mais do que um regime poderá ser testado num ambiente randomizado de fase II.

Será eleita como alvo uma população de pacientes com AR que não respondeu à terapêutica-padrão actual (falhas da terapêutica com fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) e fármacos anti-reumáticos modificadores da doença (ARMDs; p.ex., ouro e penicilamina)).

- ✓ A decisão de descontinuar ou continuar os estudos baseia-se na prova do conceito terapêutico na Fase II
- ✓ Determinar se o marcador substituto pode ser usado como indicação precoce da eficácia clínica.
- ✓ Identificar as doses para a Fase III.

Fase III

A fase III dependerá da altura em que o sinal for detectado na fase II, e das terapêuticas competidoras que são consideradas como padrão de referência. Se o sinal surgir numa fase da doença para a qual não exista terapêutica de referência, então poderá delinear-se um ensaio-pivô de um só braço e bem controlado. Se existirem agentes competidores que são considerados como terapêuticas de referência, então serão realizados estudos comparativos.

Exemplo 7: Formulação Farmacêutica Líquida para os Anticorpos Antagonistas Anti-CD40

O objectivo deste estudo foi o de investigar os efeitos do pH da solução sobre a estabilidade do anticorpo antagonista anti-CD40 CHIR-12.12, recorrendo a métodos biofísicos e bioquímicos para seleccionar o ambiente de solução óptimo para este anticorpo. Os resultados da Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC) mostraram que a estabilidade de conformação de CHIR-12.12 é óptima em formulações com um pH de 5,5-6,5. Com base numa análise combinando SDS-PAGE, HPLC de exclusão molecular (SEC-HPLC) e HPLC de troca catiónica (CEX-HPLC),

determinou-se que a estabilidade físico-química de CHIR-12.12 é ótima a um pH de cerca de 5,0-5,5. Tendo em vista estes resultados, uma formulação farmacêutica líquida recomendada compreendendo este anticorpo corresponderá a uma formulação contendo CHIR-12.12 a cerca de 20 mg/ml formulado em cerca de 10 mM de succinato de sódio, cerca de 150 mM de cloreto de sódio e possuindo um pH de cerca de 5,5.

Materiais e Métodos

O anticorpo CHIR-12.12 usado nos estudos de formulação é um anticorpo monoclonal humano produzido através de um processo de cultura de células CHO. Este mAc tem um peso molecular de 150 kDa e consiste em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas ligadas entre si por ligações dissulfeto. O anticorpo dirige-se contra o receptor de superfície celular CD40 presente em células que expressam CD40, incluindo células B normais e malignas, com o fim de tratar diversos cânceros e doenças autoimunes/inflamatórias.

A substância farmacológica anti-CD40 usada neste estudo foi um lote de anti-CD40 (CHIR-12.12) purificado derivado de células CHO. A composição da substância farmacológica foi de 9,7 mg/ml de anticorpo CHIR-12.12 em 10 mM de citrato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio a pH 6,5. A amostra de controlo neste estudo correspondeu à substância farmacológica recebida, seguida de congelamento a $\leq -60^{\circ}\text{C}$, descongelada à TA e testada juntamente com amostras de teste da estabilidade a pontos de tempo pré-determinados. As amostras para teste da estabilidade foram preparadas por diálise da substância farmacológica contra soluções a diferentes pH e a concentração de CHIR-12.12 em cada amostra foi determinada por UV 280, tal como apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Formulações de CHIR-12.12.

Composição do Tampão	pH	Concentração de CHIR-12.12 (mg/ml)
10 mM citrato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	4,5	9,0
10 mM succinato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	5,0	9,3
10 mM succinato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	5,5	9,2
10 mM citrato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	6,0	9,7
10 mM citrato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	6,5	9,4
10 mM fosfato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	7,0	9,4
10 mM fosfato de sódio, 150 mM cloreto de sódio	7,5	9,5
10 mM glicina, 150 mM cloreto de sódio	9,0	9,5

A estabilidade físico-química do anticorpo CHIR-12.12 nas diversas formulações foi ensaiada usando os protocolos que se seguem.

Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A estabilidade conformacional das diferentes amostras de formulação foi monitorizada usando um VP-DSC MicroCal com aquecimento entre 15°C e 90°C a 1°C/min.

SDS-PAGE

A fragmentação e agregação foram estimadas usando um gel de Tris-Glicina a 4-20% sob condições não redutoras e redutoras. A proteína foi detectada por coloração com azul de Coomassie.

Cromatografia de Exclusão Molecular (SEC-HPLC)

A fragmentação e agregação da proteína foram igualmente medidas por um aparelho de HPLC Water Alliance com uma coluna Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL, 100 mM de fosfato de sódio, pH 7,0 como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,7 ml/min.

Cromatografia de Troca Catiónica (CEX-HPLC)

A degradação relacionada com a alteração de carga foi medida usando um sistema de HPLC Waters 600s com uma coluna Dionex Propac WCX-10, com HEPES 50 mM, pH 7,3 como fase móvel A e HEPES 50 mM contendo NaCl 500 mM, pH 7,3 como fase móvel B, a uma taxa de fluxo de 0,5 ml/min.

Resultados e Discussão

Estudo da estabilidade conformacional.

O desdobramento térmico de CHIR-12.12 revelou pelo menos duas transições térmicas, provavelmente representando a fusão por desdobramento dos domínios Fab e Fc, respectivamente. A temperaturas superiores, a proteína provavelmente sofreu agregação, resultando na perda de sinal de DSC. Para fins de avaliação da formulação, a temperatura de transição térmica mais baixa foi definida como correspondendo à temperatura de fusão, T_m , neste estudo. A Figura 5 mostra a temperatura de fusão térmica como função dos pHs da formulação. As formulações a pH 5,5-6,5 forneceram anti-CD40 com uma estabilidade conformacional superior, tal como demonstrado pelas temperaturas de fusão térmica mais elevadas.

Análise por SDS-PAGE.

As amostras da formulação de CHIR-12.12 a pH 4,5-9,0 foram incubadas a 40°C durante 2 meses e foram submetidas a análise por SDS-PAGE (dados não apresentados). Sob condições não

redutoras, foram observadas espécies com pesos moleculares (PM) de 23 kDa e 27 kDa nas formulações com pH acima de 5,5, tendo-se observado espécies com PM de 51 kDa em todas as formulações, mas aparecendo menos a pH 5,0-5,5. Surgiu uma espécie com PM de 100 kDa a pH 7,5 e a pH 9,0.

Sob condições redutoras, CHIR-12.12 foi reduzido a cadeias pesadas e cadeias leves livres com PMs de 50 kDa e de 24 kDa, respectivamente. A espécie de 100 kDa pareceu não ser completamente redutível e aumentou com o aumento do pH da solução, sugerindo a possível ocorrência de uma associação covalente não-dissulfito nas moléculas. Uma vez que surgiram outras espécies com identidades desconhecidas na análise por SDS-PAGE, a comparação da estabilidade de cada formulação é baseada na pureza remanescente de CHIR-12.12. As formulações a pH 5,0-6,0 proporcionaram um meio mais estável para CHIR-12.12. Foram detectados poucos agregados por SDS-PAGE (dados não apresentados).

Análise por SEC-HPLC.

A análise por SEC-HPLC detectou o CHIR-12.12 intacto como a espécie do pico principal, uma espécie de agregação como espécie de um pico dianteiro separada da espécie do pico principal, uma espécie de grande fragmento como um pico de "ombro" precedendo a espécie do pico principal, e foram detectadas espécies de pequenos fragmentos após a espécie do pico principal. Após incubação a 5°C e a 25°C durante 3 meses, foram detectadas quantidades negligíveis de fragmentos e de agregados de proteínas (< 1,0%) nas formulações acima e a espécie CHIR-12.12 do pico principal permaneceu com uma pureza superior a 99% (dados não apresentados). No entanto, desenvolveram-se gradualmente fragmentos de proteínas durante a armazenagem a 40°C, e mais fragmentos se formaram a pH 4,5 e a pH 6,5-9,0, tal como mostra a Tabela 8. Após incubação das

formulações de CHIR-12.12 a 40°C durante 3 meses, foram detectados cerca de 2-3% de agregados a pH 7,5 e a pH 9,0, enquanto que nas formulações a outros pH se detectaram menos de 1% de agregados (dados não apresentados). Os resultados de SEC-HPLC indicam que CHIR-12.12 é mais estável a pH de cerca de 5,0-6,0.

Tabela 8. Resultados de SEC-HPLC das amostras de estabilidade de CHIR-12.12 sob condições de armazenagem em tempo real e aceleradas.

Amostra	% Pico principal				% Fragmentos			
	t=0	40°C 1m	40°C 2m	40°C 3m	t=0	40°C 1m	40°C 2m	40°C 3m
Controlo	99,4	99,2	99,9	99,5	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
pH 4,5	99,4	93,2	86,0	81,3	<1,0	6,4	13,2	18,1
pH 5,0	99,8	98,7	91,3	89,2	<1,0	<1,0	7,8	10,2
pH 5,5	99,8	98,9	91,4	90,6	<1,0	<1,0	7,6	8,8
pH 6,0	99,6	97,7	90,4	87,3	<1,0	1,9	8,2	11,7
pH 6,5	99,3	93,4	89,0	86,9	<1,0	5,6	9,9	12,4
pH 7,0	99,2	93,9	87,4	85,1	<1,0	5,5	11,1	13,5
pH 7,5	99,1	92,8	84,4	81,9	<1,0	6,4	12,9	16,2
pH 9,0	99,3	82,4	61,6	50,6	<1,0	15,4	36,2	47,6

Análise por CEX-HPLC.

A análise por CEX-HPLC detectou o CHIR-12.12 intacto como formando a espécie do pico principal; as variantes ácidas eluíram mais cedo do que a espécie do pico principal e as variantes de adição C-terminal de lisina eluíram após a espécie do pico principal. A tabela 9 mostra a dependência que as percentagens da espécie remanescente de CHIR-12.12 do pico principal e das variantes ácidas manifestam relativamente ao pH da solução. A amostra de controlo continha já um elevado grau de espécies ácidas (~33%), provavelmente devido a

processos de fermentação e purificação ocorridos em fases precoces. A susceptibilidade de CHIR-12.12 a soluções de pH mais elevado é evidenciada por dois factos. Em primeiro lugar, a amostra da formulação inicial a pH 9,0 (t=0) gerou à partida mais 12% de espécies ácidas do que o controlo. Em segundo lugar, a percentagem de espécies ácidas registou um aumento acentuado com o aumento de pH. A degradação relacionada com a mudança de carga é provavelmente devida a desamidação. Os dados acima indicam que este tipo de degradação de CHIR-12.12 foi minimizada no intervalo de pH de cerca de 5,0-5,5.

Tabela 9. Percentagem de área de pico, em CEX-HPLC, correspondente a CHIR-12.12 em formulações de diferentes pH sob condições de armazenagem em tempo real e aceleradas.

Amostra	% pico principal					% variantes ácidas				
	t=0	5°C 3 m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3 m	25°C 3 m	40°C 1 m	40°C 2 m
Controlo	49,2	49,8	49,8	49,2	50,3	32,0	33,7	33,7	32,0	33,6
pH 4,5	48,5	49,7	43,7	39,7	30,0	32,5	32,6	38,0	44,2	56,4
pH 5,0	49,6	49,8	48,3	40,6	31,4	32,7	31,8	35,0	44,3	57,1
pH 5,5	50,7	50,3	48,1	40,0	30,2	32,6	31,8	37,8	48,9	63,3
pH 6,0	50,2	49,9	47,9	37,4	23,9	33,1	33,6	38,5	54,9	72,7
pH 6,5	49,4	49,9	42,3	29,7	14,6	33,3	33,6	47,7	65,2	84,6
pH 7,0	49,7	49,9	21,9	-	-	34,4	36,4	64,4	-	-
pH 7,5	49,3	48,3	12,7	-	-	35,5	40,1	79,2	-	-
pH 9,0	41,3	31,8	-	-	-	44,7	59,9	-	-	-

Conclusão

O pH tem um efeito significativo sobre as estabilidades conformacional e fisico-química de CHIR-12.12. A degradação relacionada com a mudança de carga foi determinada como sendo a principal via de degradação de CHIR-12.12, tendo esta sido minimizada a pH 5,0-5,5. Com base nos dados globais de estabilidade, uma formulação farmacêutica líquida recomendada compreendendo este anticorpo será uma formulação compreendendo CHIR-12.12 a cerca de 20 mg/ml formulado em cerca de 10 mM de

succinato de sódio, cerca de 150 mM de cloreto de sódio e possuindo um pH de cerca de 5,5.

Os peritos no campo técnico a que pertencem estas invenções reconhecerão a possibilidade de efectuar muitas modificações e de criar outras formas de realização das invenções aqui apresentadas, tomando como base os ensinamentos apresentados nesta descrição e nas Figuras associadas. Assim, deve depreender-se que as invenções não devem ser limitadas às formas de realização específicas que foram apresentadas, e que as modificações e outras formas de realização possíveis são entendidas como pertencendo ao âmbito das reivindicações anexas e das formas de realização aqui expostas. Se bem que nesta exposição se tenham utilizado alguns termos específicos, estes foram usados apenas num sentido genérico e descritivo e não com fins limitativos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Long, Li

Lugman, Mohammad

Yabannavar, Asha

Zaror, Isabel

<120> UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E INFLAMATÓRIAS E DA REJEIÇÃO AO TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS

<130> PP23725.001 (284072)

<150> 60/565,710

<151> 2004-04-27

<150> 60/525,579

<151> 2003-11-26

<150> 60/517,337

<151> 2003-11-04

<160> 12

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência codificante para a cadeia leve do anticorpo anti-CD40 humano CHIR-12.12.

<221> CDS

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

<400> 1

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

100	105	110	
tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa			384
Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys			
115	120	125	
gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg			432
Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro			
130	135	140	
cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg			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 aaa			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> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia leve do anticorpo anti-CD40 humano CHIR-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> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência codificante para a cadeia pesada do anticorpo anti-CD40 humano CHIR 12.12 (com introns)

<400> 3


```

atggagtttg ggctgagctg ggttttccct gtgtctattt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagtttg tggagtcttg gggaggcctg gtccagcctg ggaggteccct gagaotctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccagggtcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcataatgagg aaagtaatag ataccatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatgggggt 360
atagcagcac ctgggcctga ctactggggt cagggaaccc tggtaacgt ctctcagca 420
agtaccaagg gcccatccgt cttccccctg gcgcccgtta gcaagagcac ctctgggggc 480
acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac acaagggtgg acaagagagt tggtgagagg 720
ccagcacagg gagggggggt gtctgtctga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca 780
tcccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc tcttcacccg 840
gaggcctctg cccgccccac tcattgctcag ggagagggtc ttctggcttt tccccaggc 900
tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcagggtc 960
tgggtctaga cctgccaaga gccatactcg ggaggacct gccctgacc taagcccacc 1020
ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacct ctctcctccc agattccagt 1080
aactccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 1140
gtgccagggt aagccagccc aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgcccctag 1200
agtagcctgc atccaggagc aggccccagc cgggtgctga cagctccacc tccatctctt 1260
ectcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttccct cttcccccca aaacccaagg 1320
acacctcat gatctcccg accctgagg tcacatgctt ggtgggtggc gtgagccacg 1380
aagacctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggagggtgcat aatgccaaga 1440
caaagcccg gaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1500
tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc 1560
cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggtg gacccgtggg gtgcgagggc 1620
cacatggaca gaggccggct cggccacccc tctgcccctga gagtgaaccg tgtaccaacc 1680
tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1740
gagatgacca agaaccagggt cagcctgacc tgccctggta aaggcttcta tcccagcgac 1800
atgcccgtgg agtgggagag caatgggcag cgggagaaca actacaagac cagcctccc 1860
gtgtgtgact ccgacggctc cttcttcttc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1920
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctgca caaccactac 1980
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 2016

```

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia pesada do anticorpo anti-CD40 humano CHIR 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	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Val	Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Ser	Asn	Arg	Tyr	His	Ala
65					70				75						80
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Ile
			85					90						95	
Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asp	Gly	Gly	Ile	Ala	Ala	Pro	Gly	Pro	Asp	Tyr
		115					120					125			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
	130					135					140				
Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ala	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
145					150					155					160
Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
			165					170						175	
Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
			180					185					190		
Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
	195						200				205				
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
	210					215					220				
Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys
225					230					235					240
Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
			245					250						255	
Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
			260					265					270		
Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
	275						280					285			
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
	290					295				300					
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
305					310					315					320
Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
			325					330						335	
Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
		340						345					350		
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
	355						360					365			
Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
	370					375					380				
Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
385				390						395					400
Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
			405					410						415	
Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
		420					425						430		
Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
	435						440					445			
Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
	450					455					460				
Leu	Ser	Pro	Gly	Lys											
465															

<210> 5

<211> 469

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia pesada da variante do anticorpo anti-CD40 humano
CHIR-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 Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

<210> 6

<211> 239

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia leve do anticorpo anti-CD40 humano CHIR 5.9.

<400> 6

Met	Ala	Leu	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Met	Leu	Trp	Val	Pro
1				5				10						15	
Gly	Ser	Ser	Gly	Ala	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Pro	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro
			20					25					30		
Val	Thr	Leu	Gly	Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser
	35						40					45			
Leu	Val	His	Ser	Asp	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp	Leu	Gln	Gln	Arg
	50					55					60				
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Phe	Phe	Arg	Arg	Leu
65					70					75					80
Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	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	Val	Thr	Gln	Phe	Pro	His	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg
	115						120					125			
Leu	Glu	Ile	Lys	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> 7

<211> 474

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Cadeia pesada do anticorpo anti-CD40 humano CHIR 5.9

<400> 7

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

133

<220>

<223> Cadeia pesada da variante do anticorpo anti-CD40 humano
CHIR 5.9.

<400> 8

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

65					70					75				80	
Pro	Ser	Phe	Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
		115					120					125			
Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	130					135					140				
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
145					150					155					160
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			165						170					175	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		180						185					190		
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	195						200					205			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
	210					215					220				
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
225				230						235					240
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			245					250						255	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		260						265					270		
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	275						280					285			
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
	290					295				300					
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
305				310						315					320
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			325					330						335	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
		340						345					350		
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	355						360					365			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
	370					375					380				
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
385				390						395					400
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			405					410						415	
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		420						425					430		
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	435						440					445			
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
	450					455					460				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
465					470										

<210> 9

<211> 612

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(612)

<221> caract_mista

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

<223> Sequência codificante para a isoforma curta do CD40 humano

<400> 9

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 tgc 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	432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu	
130 135 140	
ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa	480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys	
145 150 155 160	
tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tgc gct gag agc cct ggt ggt	528
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly	
165 170 175	
gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt	576
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly	
180 185 190	
ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa	612
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *	
195 200	

<210> 10

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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> 11

<211> 834

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

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

<221> caract_mista

<222> (0)..(0)

<223> Sequência codificante para a isoforma longa do CD40 humano

<400> 11

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 tgg 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 145 150 155 160			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 Glu Ile Asn Phe Pro Asp 225 230 235 240			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 *			834
275			

<210> 12

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Lisboa, 3 de Dezembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser isento de actividade agonista significativa quando se liga ao antígeno CD40 expresso à superfície da referida célula, para uso num método de tratamento de um indivíduo humano para uma doença inflamatória ou uma doença autoimune, o método compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal humano anti-CD40, sendo o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 humano seleccionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo com a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12; e

d) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como

Depósito Patentado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva.

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), sendo que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

2. O uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40 no fabrico de um medicamento para o tratamento de um indivíduo humano para uma doença inflamatória ou auto-imune, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser isento de actividade agonista significativa, quando se liga ao antígeno CD40 expresso à superfície da referida célula, sendo o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo com a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patentado N° PTA-5542, ou ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patentado N° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12; e

d) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de

hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patentado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patentado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), sendo que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antigénio CD40 humano.

3. O anticorpo monoclonal, de acordo com a Reivindicação N°.1 ou o uso de acordo com a Reivindicação N°.2, caracterizado por a referida doença inflamatória ou doença autoimune ser seleccionada a partir do grupo que consiste em lúpus eritematoso sistémico (LES), lúpus discóide, lúpus nefrítico, sarcoidose, artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante, artrite gotosa, rejeição do transplante de um órgão ou tecido, doença de 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, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença por complexos imunes, síndrome de disfunção imune e fadiga crónica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinémia, trombólise, cardiomiopatia, pénfigo, fibrose pulmonar intersticial, sarcoidose, diabetes mellitus Tipo I e Tipo II, hipersensibilidade retardada dos tipos 1, 2, 3 e 4, alergias ou distúrbios alérgicos, asma, síndrome de Churg-Strauss (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite

alérgica e de irritação por contacto, urticária, alergias mediadas por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer e polineuropatia inflamatória desmielinizante crónica.

4. Um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antigénio CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser isento de actividade agonista significativa quando se liga ao antigénio CD40 expresso à superfície da referida célula, para uso num método de tratamento de um indivíduo humano contra a rejeição de um transplante, o método compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal humano anti-CD40, sendo o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo com a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12; e

d) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-

5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva, e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), sendo que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

5. O uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40 no fabrico de um medicamento para o tratamento de um indivíduo humano contra a rejeição de um transplante, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser isento de actividade agonista significativa, quando se liga ao antígeno CD40 expresso à superfície da referida célula, sendo o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo com a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12; e

d) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patentado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patentado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva, e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), sendo que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antigénio CD40 humano.

6. O anticorpo monoclonal, de acordo com a Reivindicação N°.4, ou o uso, de acordo com a Reivindicação N°.5, caracterizado por o referido tratamento compreender ainda a administração de um agente imunossupressor num excipiente farmacologicamente aceitável.

7. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com a Reivindicação N°.6, caracterizado por o agente imunossupressor ser seleccionado a partir do grupo que consiste em ciclosporina, FK506, rapamicina, corticosteróides, CTLA4-Ig e anticorpo anti-Estimulador dos Linfócitos B.

8. Um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antigénio CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser isento de actividade agonista significativa quando se liga ao antigénio CD40 expresso à superfície da referida célula, para uso num método de tratamento de um indivíduo humano para a artrite reumatóide, o método compreendendo a administração ao referido indivíduo de uma quantidade eficaz do anticorpo monoclonal humano anti-CD40,

sendo o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 selecionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo com a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12; e

d) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva, e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), sendo que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

9. O uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que tem a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana que expressa CD40, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um indivíduo humano para a artrite reumatóide, caracterizado por o referido

anticorpo monoclonal ser isento de actividade agonista significativa, quando se liga ao antigénio CD40 expresso à superfície da referida célula, sendo o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 seleccionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo com a capacidade de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-87 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende os resíduos 82-89 da sequência do CD40 humano apresentada na SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12; e

d) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, ou com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que é obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva, e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo monoclonal segundo qualquer um dos itens precedentes a)-d), sendo que o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antigénio CD40 humano.

10. O anticorpo monoclonal, de acordo com a Reivindicação N°.8, ou o uso, de acordo com a Reivindicação N°.9, caracterizado por o referido tratamento compreender ainda a

administração de um agente imunossupressor num excipiente farmacologicamente aceitável.

11. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com a Reivindicação N°.10, caracterizado por o agente imunossupressor ser seleccionado a partir do grupo que consiste em ciclosporina, FK506, rapamicina, corticosteróides, CTLA4-Ig, um anticorpo anti-CD20 e anticorpo anti-Estimulador dos Linfócitos B.

12. O anticorpo monoclonal, o uso, de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes, caracterizado por o referido anticorpo ser um anticorpo monoclonal seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- (i) um anticorpo monoclonal compreendendo um domínio variável de cadeia leve contendo os resíduos 44-54, 70-76 e 109-117 da SEQ ID NO:2 ou da SEQ ID NO:6;
- (ii) um anticorpo monoclonal compreendendo um domínio variável de cadeia pesada contendo os resíduos 50-54, 69-84 e 114-121 da SEQ ID NO:4 ou da SEQ ID NO:7;
- (iii) um anticorpo monoclonal compreendendo um domínio variável de cadeia leve contendo os resíduos 46-52, 70-72 e 111-116 da SEQ ID NO:2 ou da SEQ ID NO:6; e
- (iv) um anticorpo monoclonal compreendendo um domínio variável de cadeia pesada contendo os resíduos 45-51, 72-74 e 115-120 da SEQ ID NO:4 ou da SEQ ID NO:7.

13. O anticorpo monoclonal, ou o uso de acordo com a Reivindicação N°.12, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal compreender uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

- (i) resíduos 21-132 da SEQ ID NO:2;
- (ii) resíduos 21-239 da SEQ ID NO: 2;
- (iii) SEQ ID NO: 2;
- (iv) resíduos 20-139 da SEQ ID NO:4;
- (v) resíduos 20-469 da SEQ ID NO:4;

- (vi) SEQ ID NO:4;
- (vii) resíduos 20-469 da SEQ ID NO:5;
- (viii) SEQ ID NO:5;
- (ix) resíduos 21-132 da SEQ ID NO:2 e resíduos 20-139 da SEQ ID NO:4;
- (x) resíduos 21-239 da SEQ ID NO:2 e resíduos 20-469 da SEQ ID NO:4;
- (xi) resíduos 21-239 da SEQ ID NO:2 e resíduos 20-469 da SEQ ID NO:5;
- (xii) SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:4; e
- (xiii) SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:5.

14. O anticorpo monoclonal, ou uso, de acordo com a Reivindicação N°.12, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal compreender uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

- (i) resíduos 21-132 da SEQ ID NO:6;
- (ii) resíduos 21-239 da SEQ ID NO: 6;
- (iii) SEQ ID NO: 6;
- (iv) resíduos 20-144 da SEQ ID NO:7;
- (v) resíduos 20-474 da SEQ ID NO:7;
- (vi) SEQ ID NO:7;
- (vii) resíduos 20-474 da SEQ ID NO:8;
- (viii) SEQ ID NO:8;
- (ix) resíduos 21-132 da SEQ ID NO:6 e resíduos 20-144 da SEQ ID NO:7;
- (x) resíduos 21-239 da SEQ ID NO:6 e resíduos 20-474 da SEQ ID NO:7;
- (xi) resíduos 21-239 da SEQ ID NO:6 e resíduos 20-474 da SEQ ID NO:8;
- (xii) SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:7; e
- (xiii) SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO:8.

15. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes, caracterizado por o

referido anticorpo monoclonal se ligar ao referido antigénio CD40 humano com uma afinidade (K_D) de, pelo menos, 10^{-6} M.

16. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal se ligar ao referido antigénio CD40 humano com uma afinidade (K_D) de, pelo menos, 10^{-8} M.

17. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por o referido anticorpo ser seleccionado do grupo que consiste no anticorpo monoclonal CHIR-5.9, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5542, e o anticorpo monoclonal CHIR-12.12, que pode ser obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Depósito Patenteado N° PTA-5543;

18. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado por o referido fragmento ser seleccionado a partir do grupo que consiste num fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fv e um fragmento Fv de cadeia única.

19. O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com qualquer das Reivindicações precedentes, caracterizado por o referido anticorpo monoclonal ser produzido por uma linha celular CHO.

Lisboa, 3 de Dezembro de 2010

FIGURA 1A

Cadeia leve de CHIR 12.12:

leader:

MALPAQLLGLMLWVSGSSG

variável:

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYNGYNYLDWYLQKPCQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQNKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 1B

Cadeia pesada de CHIR-12.12:

leader:

MEPGLSWVFLVAILRGVQC

variável:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLWVAIVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDNKITYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLLTVSS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF
LFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQFENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

região constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVF
LFPFKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQFENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 2A

FIGURA 3A

Cadeia leve de CHIR-5.9:

leader:

MALLAQLLGLLMLNVPGSSG

variável:

AIVNTQPPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRFGQPPRLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVTQFPHTFGQGTREIK

constante:

RTVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYERHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIGURA 3B

Cadeia pesada de CHIR-5.9:

leader:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variável:

EVQLVQSGAEVKKPQGESLKISCKGSGYSFTSTYWGIVRQMPGKGLEWMGIIPGDSSTRYSP
SFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTAAGRDIYIYGMVWVGQGTITVTS
S

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

região constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFPLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 4A

Sequência codificante para a isoforma curta do CD40 humano:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tctgaccgc tgcctatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag taactaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcaccct agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggetggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggcttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggittctgat
421 accatctgcg agcctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgcacctgc ttctgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaaggtc ccaggatcg gctgagagcc ctgggtgga tccccatcat
541 ctctgggac ctgttgcca tctcttggg gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaccaat aa

```

FIGURA 4B

Isoforma curta codificada do CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylnsqccsl cqpqqklvsd cteftetecl
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlgir vqqkgtsetd ticceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespqgdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq

```

FIGURA 4C

Sequência codificante para a isoforma longa do CD40 humano:

```

1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtctc tggggtgct tctgaccgc tgcctacca
61 gaaccacca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagt ctgtctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcaactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggacagag agacacactc ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgag agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc ttctgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaagctg tgagacaaa gacctgggtg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tcccaggat cggctgagag ccttgggtgt gatccccatc
601 atctcggga tctgtttgc catctcttg gtctgtgtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa ttctccgac
721 gatctctg gtccaacac tctgtctcca gtgcaggaga cttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccagg aggatggcaa agagagtcgc atctcagtc aggagagaca gtga

```

FIGURA 4D

Isoforma longa codificada do CD40 humano:

```

1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cqpqqklvsd cteftetecl
61 pgesefldt wnrethchqh kyedpnlgrr vqqkgtseld tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcvvgf fsnvssafek chpwtscetk dlrvvqqagtn
181 ktdvvcpqd rralvvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq

```

FIGURA 5

