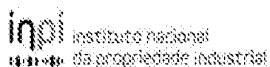


---

(11) Número de Publicação: **PT 1694360 E**



(51) Classificação Internacional:  
**C07K 16/28** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

---

(22) Data de pedido: **2004.11.04**

(30) Prioridade(s): **2003.11.04 US 517337 P**  
**2003.11.26 US 525579 P**  
**2004.04.27 US 565710 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2006.08.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.08.04**  
**238/2010**

(73) Titular(es):

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS INC.**  
**4560 HORTON STREET, EMERYVILLE,**  
**CALIFORNIA 94608** US

(72) Inventor(es):

**LI LONG** US  
**MOHAMMAD LUQMAN** US  
**ASHA YABANNAVAR** US  
**ISABEL ZAROR** US

(74) Mandatário:

**FRANCISCO NOVAES CUNHA BRITO SOTO MAIOR DE**  
**ATAYDE**  
**AV. DUQUE D'AVILA, N.º 32, 1º ANDAR 1000-141 LISBOA PT**

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

(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**

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

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抗原 a um paciente que dela necessite. O anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao抗原 é isento de actividade agonista significativa, mas exibe actividade antagonista quando o anticorpo se liga ao抗原 CD40 numa célula humana que expressa o CD40. A actividade antagonista do anticorpo anti-CD40 ou do seu fragmento de ligação ao抗原 inibe de 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>	<b>"UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTAGONISTAS ANTI-CD40 PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS AUTO-IMUNES E INFLAMATÓRIAS E DA REJEIÇÃO AO TRANSPLANTE DE ORGÃOS"</b>
-----------------	--

### 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抗原CD40 é um抗原 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抗原(APCs), das células endoteliais, dos monócitos, das células T CD8+ e das células epiteliais. O抗原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- $\alpha$  (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 functional 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 $\gamma$ 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 mAcS 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抗ígeno 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- $\kappa$ B) e das I-kappa B kinases (IKK  $\alpha/\beta$ ), tendo como resultado final a activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ 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 $\alpha$  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抗ígeno CD40 como o ligando de CD40 são sobreexpressos nas lesões ateroescleróticas 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 metaloproteinases 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抗igeno 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抗igeno.

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抗ígenio 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抗ígenio CD40 expresso à superfície da dita célula, para uso num método para o tratamento de um individuo humano que sofre de doença inflamatória ou auto-imune, caracterizado por compreender a administração ao dito individuo 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 Nº 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 Nº 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 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 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 para a doença auto-imune ou inflamatória, estando o dito anticorpo isento de actividade agonista significativa, quando se liga ao antigénio 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 Nº PTA-5543;
- b) Um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que comprehende 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 comprehende 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 Nº 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 Nº 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 igualmente um anticorpo monoclonal humano anti-CD40 que tem a capacidade de se ligar especificamente ao antigénio CD40 humano, estando o dito anticorpo monoclonal substancialmente isento de actividade agonista significativa quando ligado ao antigénio 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 Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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 Nº 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 Nº 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 Nº 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 Nº PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva; e
- e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗igénio 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 rematóide, estando o dito anticorpo isento de actividade agonista significativa, e verificando-se que, quando se liga ao抗igénio 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 comprehende 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 comprehende 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.

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 antigénio que é isento de actividade agonista significativa quando ligado a um antigénio CD40 numa célula humana que expressa CD40. São igualmente apresentados métodos para a inibir a resposta de células que expressam o antigénio 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 antigénio têm a capacidade de se ligar especificamente a um antigénio CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana. Estão isentos de actividade agonista significativa mas exibem actividade antagonista quando ligados ao antigénio CD40 em células humanas. Em uma das formas de realização, o anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento exibe actividade antagonista quando ligado ao antigénio CD40 em células apresentadoras de antigénio 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, psoriase, 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, 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 antigénio de superfície celular CD40. Estes anticorpos anti-CD40 e os seus fragmentos de ligação ao antigénio são isentos de actividade agonista significativa e exibem actividade antagonista quando ligados ao antigénio 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 antigénio, as imunoglobulinas incluem tanto os anticorpos como outras moléculas semelhantes a anticorpos que não possuem especificidade antigénica. Os polipeptídos 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 antigénio (p.ex., Fab', F' (Ab)<sub>2</sub>, 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 antícorpo particular para o seu抗ígeno 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  $\beta$ , ligadas por três CDRs, as quais formam "loops" que ligam, e em alguns casos integram, a estrutura em folha  $\beta$ . 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抗原 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抗原, 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抗原. 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<sup>a</sup> 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抗原 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抗原, designados por fragmentos "Fab", cada um com um único local de ligação ao抗原, 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抗原 e tem a capacidade de estabelecer duas ligações com os抗原s.

"Fv" corresponde ao mínimo fragmento de anticorpo que contém um local completo de reconhecimento e ligação ao抗原. 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抗原 à superfície do dímero  $V_H-V_L$ . Colectivamente, as seis CDRs conferem ao anticorpo a especificidade de ligação ao抗原. No entanto, mesmo um só domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicos para um抗原) tem a capacidade de reconhecer e de se ligar a um抗原, 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 "dobradica" 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 "dobradica" 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 (k) e lambda ( $\lambda$ ) 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, epsilon, 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-iões 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 $\gamma$ RIII e desempenham a função efetora de citotoxicidade mediada por células e dependente do抗ígeno (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 isótipos 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 isótipo 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 $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII e Fc $\gamma$ RIII e também as variantes alélicas e as formas de splicing alternativo destes

receptores. Os receptores Fc $\gamma$ RII incluem Fc $\gamma$ RIIA (um "receptor activador") e Fc $\gamma$ RIIB (um "receptor inibidor"), os quais têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O receptor activador Fc $\gamma$ RIIA contém um motivo de activação do imunoreceptor baseado em tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor inibidor Fc $\gamma$ RIIB contém um motivo de inibição do imunoreceptor baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático (ver Daeron (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 transgénicos (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抗原 (Jakobovits et al. (1993) *Nature* 362:255-258). Mendez et al. (1997) (*Nature Genetics* 15:146-156) criaram uma linha de ratinhos transgénicos que, quando estimulados por um抗原, 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  $V_K$ , segmentos  $J_K$  e genes  $C_K$ . 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 antigénio de interesse particular.

Os soros de tais animais imunizados podem ser rastreados quanto à reactividade dos anticorpos contra o antigénio 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 antigénio inicial, de preferência. Tal análise inclui ELISA com o alvo/proteína antigénica, um ensaio de competição com anticorpos conhecidos que se ligam ao antigénio de interesse, e a ligação *in vitro* a células CHO ou outras transitoriamente transfetadas que expressam o antigénio 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 antigénio, sendo que a administração do anticorpo ou do fragmento de ligação ao antigénio 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, sindroma de Reiter, espondilite anquilosante e artrite gotosa, rejeição de um transplante de orgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crónica e/ou doença de enxerto versus hospedeiro, esclerose múltipla, sindroma de hiper-IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, doença celiaca (enteropatia sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoriase, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença por complexos imunes, sindroma de disfunção imune e fadiga crónica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinémia, trombólise, cardiomiopatia, pênfigo vulgaris, fibrose pulmonar intersticial, diabetes mellitus Tipo I e Tipo II e semelhantes. Adicionalmente estes anticorpos antagonistas anti-CD40 e os seus fragmentos de ligação ao抗原 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, sindroma 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抗原 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 antícorpo 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 dendítricas, 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 IgG<sub>1</sub> 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 IgG<sub>1</sub> 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 subclonados 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 transgénicos para os loci 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  $5 \times 10^{-10}$  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  $3 \times 10^{-5}$  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 Nº de Acesso Genbank CAA43045, e identificada como isoforma 1 com o Nº 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 (Nº de Acesso Genbank NP\_690593), codificado pela SEQ ID NO:9 (Nº 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 epítopo 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 transdução através do receptor CD40 por vias tais como TRAF (por exemplo, TRAF2 e/ou TRAF3), MAP kinases como a NIK (kinase indutora de NF-κB), as I-kappa B kinases (IKK α/β), o factor de transcrição NF-κB, Ras e a via de MEK/ERK, a via de PI3K/Akt e a via de P38 MAPK, e semelhantes; transdução 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” exibe 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抗ígeno CD40 numa célula humana. Em uma das formas de realização desta invenção, o antícorpo 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抗原 CD40, incluindo anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia única, e fragmentos destes tais como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub> e outros fragmentos que retêm a função de ligação ao抗原 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 nº PTA-5542 e Depósito Patenteado nº 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 seleccionada 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 epitopo 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 epitopo 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抗原 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抗原 CD40 humano. Os peritos na técnica reconhecerão que os anticorpos antagonistas anti-CD40, e seus fragmentos de ligação ao抗原 desses anticorpos, adequados para uso os métodos aqui descritos incluem anticorpos antagonistas anti-CD40 e fragmentos de ligação ao抗原 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抗ígenio 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抗ígenio 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 Nº.6.004.552. Abreviadamente, as sequências codificando para o CD40 humano foram recombinadas num baculovírus usando vectores de transferência. Os plasmídeos foram co-transfetados 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 homogéneos, 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')<sub>2</sub>, Fv e outros, que retêm a função de ligação ao抗原 do anticorpo. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um só local抗原的, i.e., o抗原 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抗原. O termo "monoclonal" indica que o anticorpo foi obtido a partir de uma população substancialmente homogénea 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 nº 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 antigénio 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 antigénio CD40. Os epitopos do antigénio 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 antigénio 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 rato é imunizado com uma solução contendo um抗原. A imunização pode ser realizada misturando ou emulsificando a solução que contém o抗原 em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante tal como o adjuvante completo de Freund, e injetando a mistura ou emulsão parenteralmente. 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抗原 de interesse. As células B que expressam imunoglobulinas ligadas à membrana específicas para o抗原 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抗原 de interesse (e que não se liguem a抗原s não relacionados). Os hibridomas secretores do anticorpo monoclonal (mAb) 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 transfetados 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. Opinion in 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 transfetada 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抗ígeno, 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抗ígenos 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 químérico com uma região variável murina e uma região constante humana. Para os fins da presente invenção a região constante do anticorpo químérico é, de preferência, substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo químérico 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 antigénio humano de superfície celular CD40 ou contra material que compreenda um antigénio 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 químéricos anti-CD40, indica um antícorpo químérico 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; Verhoeven 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抗原 pré-determinado.

São também abrangidos pelo termo "anticorpos anti-CD40" os anticorpos anti-CD40 xenogénicos ou modificados produzidos num hospedeiro mamífero não humano, mas 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 transgénicos. 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 transgénicos para o locus de cadeia pesada de IgG<sub>1</sub> humana e para o locus de cadeia leve κ humana foram imunizados com células Sf9 que expressam CD40 humano. Os ratinhos podem ainda ser transgénicos 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 antícorpo de extensão completa. Assim, um fragmento de um antícorpo anti-CD40 reterá a capacidade de se ligar ao抗原 CD40 da superfície das células B. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades semelhantes às do antícorpo antagonista anti-CD40 de extensão completa correspondente, isto é, os fragmentos ligar-se-ão especificamente a um抗原 CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana e estão isentos de actividade agonista significativa mas exibem actividade antagonista quando ligados a um抗原 CD40 numa célula que expressa CD40 humano. Tais fragmentos são aqui referidos como fragmentos "de ligação ao抗原".

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

Fv e as moléculas de anticorpo de cadeia única. Por "Fab" entende-se um fragmento monovalente de ligação ao抗igénio de uma imunoglobulina que é composto pela cadeia leve e por parte da cadeia pesada. Por F(ab')<sub>2</sub> entende-se um fragmento bivalente de ligação ao抗igénio 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<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> 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<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> que permite que o sFv forme a estrutura desejada para a ligação ao抗igénio. Para uma revisão dos sFv, ver Pluckthun (1994) em The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, ed. Rosenburg & Moore (Springer-Verlag, New York, págs. 269-315. Os fragmentos de ligação ao抗igénio 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')<sub>2</sub> (Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')<sub>2</sub> 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 antícorpo 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 antícorpo 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 antícorpo 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 CD40L 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<sup>+</sup>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抗igénio 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 epítopo 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 epítopo 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-antígeno 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-fatores enzimáticos, inibidores enzimáticos, complexos de grupos prostéticos, radicais livres, partículas, corantes e outros. Os exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase ou acetilcolinesterase; os exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes apropriados incluem umbelifera, 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  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{3}\text{H}$ . 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  $^{32}\text{P}$  e  $^{125}\text{I}$ ), 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's 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  $^{125}\text{I}$ , 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<sup>a</sup> 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 Nº 4.676.980. Adicionalmente, poderão usar-se linkers entre os marcadores e os anticorpos da invenção (ver a Patente dos EUA Nº 4.831.175). Os anticorpos, ou os seus fragmentos de ligação ao抗原, poderão ser directamente ou indirectamente marcados (Patente dos EUA Nº 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抗ígenio 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抗ígenio 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 criarião 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 correções 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抗原 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 acídico 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 (glycosilação) 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抗igénio CD40. Por "células que expressam CD40" pretende-se referir células que expressam o抗igénio 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 antígenio(s) de não-self, incluindo, por exemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos 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 antígenos do "self". Nas doenças autoimunes, o(s) antígeno(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, antígenos HLA, antígenos 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 antígenos 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抗igénios do hospedeiro.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 e seus fragmentos de ligação ao抗igénio 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, sindroma de Reiter, espondilite anquilosante e artrite gotosa, rejeição de um transplante de orgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crónica e/ou doença de enxerto versus hospedeiro, esclerose múltipla, sindroma de hiper-IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, doença celiaca (enteropatia sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoriase, escleroderma, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença por complexos imunes, sindroma 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, sindroma 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抗原, 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抗原 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抗原) 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抗原 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抗原), 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抗原, 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 computorizada (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抗ígeno poderá experienciar o efeito benéfico de uma melhoria dos sintomas associados à doença.

Os termos "dose ou quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" pretendem indicar uma quantidade de anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗ígeno 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抗原.

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,  $\beta$ -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  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^3\text{H}$ .

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, ou os seus fragmentos de ligação ao抗原 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 psoriase), terapêutica imunosupressora, 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抗原, 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 psoriase), terapêutica imunosupressora, 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抗igénio 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抗igénio 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抗igénio 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抗igénio, 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抗igénio, são administrados em combinação com fármacos imunosupressores 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 imunosupressores 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 imunosupressoras, 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, meoxicam, nabumetona, naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib, salicilatos, sulindac e tolmetina; anticorpos anti-inflamatórios tais como adalimumab (HUMIRA®, um antagonista de TNF- $\alpha$ ) e infliximab (Remicade®, um antagonista de TNF- $\alpha$ ), 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 orgão/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 imunosupressores 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 imunosupressores 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 imunosupressoras, 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 imunosupressores 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 imunosupressores 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 imunosupressoras, 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 imunosupressores 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 imunosupressores 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 imunosupressoras, 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 injecção quer intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. Os métodos para realizar esta administração são conhecidos dos técnicos de perícia médica. 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 injecção, 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 farmaceuticamente 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<sup>a</sup> Ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990). Ver também, por exemplo, WO 98/56418, que descreve as formulações farmacéuticas 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抗原 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抗原, 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抗原 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抗原, por exemplo o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao抗原, 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 terapeuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗原 ao longo de cada semana de dosagem com anticorpo. Alternativamente, poderão usar-se diferentes doses terapeuticamente eficazes de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗原 ao longo do curso de um período de tratamento.

Em algumas formas de realização, a dose terapeuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗原, 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 terapeuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗原, 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 terapeuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗原 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 terapeuticamente eficazes subsequentes de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de um seu fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 que é administrada ao indivíduo, sendo que a dose administrada de anticorpo ou de um seu fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 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抗原. 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抗原 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抗原 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抗原 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 polipeptídos 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 comprehende o polipéptido variante possui o mesmo efeito terapêutico que a composição farmacêutica que comprehende o polipéptido nativo quando administrada a um indivíduo. Isto é, o antícorpo variante anti-CD40 funciona como um componente terapeuticamente activo na composição farmacêutica de um modo semelhante ao observado com o antícorpo 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 antícorpo 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 antícorpo antagonista nativo, incluindo os ensaios aqui descritos.

Qualquer composição farmacêutica que comprehenda um antícorpo 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 terapeuticamente 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,  $\alpha$  e  $\beta$ -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 arabitol. 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 levógiras (L) da carnitina,

arginina e betaina; 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 alanol. 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 hidroxi, correspondendo este mais preferencialmente a um grupo hidroxi terminal. É este grupo hidroxi 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 Nº 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抗原. Isto é, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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 iônica. Ver, por exemplo, os métodos abaixo expostos.

Um anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao抗原, 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抗原, 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抗原, é formulado numa formulação farmacêutica líquida. O anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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抗原. A quantidade de anticorpo ou do fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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抗原, 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 fisico-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-ião 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 farmacéutica 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 mállico 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 farmacéutica 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 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-ião 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抗原, 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抗原, 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 farmaceuticamente 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抗原, 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 conecerá 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抗原, 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抗igénio, 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抗igénio, 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抗igénio, 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抗igénio, 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 polioxieteno-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 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; 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抗原, 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 afectem adversamente a estabilidade fisico-química do anticorpo antagonista anti-CD40 ou do seu fragmento de ligação ao抗原. 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 farmaceuticamente aceitáveis em Remington's Pharmaceutical Sciences (18<sup>a</sup> 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 degradação. Os métodos para a liofilização de composições líquidas são bem conhecidos dos técnicos de perícia médica. 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抗原 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, tiroidectomia, 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 imunosupressora, 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 antígeno, 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 antígeno, 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抗原, 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抗原. 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抗原. 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抗原 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 IgG<sub>1</sub> humano, gerados por imunização de ratinhos transgénicos portadores do locus de cadeia pesada de IgG<sub>1</sub> 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 rato em vez de cadeia kappa humana. Os anticorpos contendo cadeia leve lambda de rato 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 rato 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  $5 \times 10^{-10}$  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 $\kappa$ 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 IKK ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (via de NF $\kappa$ 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 dadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Foram então adicionados CHIR-12.12 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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  $\beta$ -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 dadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). Foram então adicionados CHIR-12.12 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 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  $\beta$ -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 $\alpha$  (Ser180) e de IKK  $\beta$  (Ser 181) em células B normais.

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

Abreviadamente, a estimulação por sCD40L resultou na fosforilação de IKK $\alpha$  (Ser 180) e de IKK  $\beta$  (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 dadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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 dadores 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 dadores 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 controlos de  $\beta$ -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 $\alpha$  (Ser 180) e IKK $\beta$  (Ser 181), Akt, ERK e p38 em células B normais.*

Nestas experiências,  $1,0 \times 10^6$  células B humanas normais de dadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram colocadas em privação de soro em meio contendo 1% de FBS e foram estimuladas com 1  $\mu$ g/ml de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). As culturas foram tratadas com CHIR-12.12 (1 e 10  $\mu$ g/ml) e IgG de controlo. As células foram colhidas aos 0 e aos 20 minutos. Detectou-se fosfo-IKK $\alpha$ , fosfo-IKK $\beta$ , IKK $\beta$  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 $\alpha/\beta$ , 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 dadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram colocadas em privação de soro em meio contendo 1% de FBS e foram estimuladas com 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de sCD40L (Alexis Corp., Bingham, Nottinghamshire, UK). As culturas foram também tratadas com CHIR-12.12 (1 e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Wortmanin (um inibidor de PI3K/Akt, 1 e 10  $\mu\text{M}$ ), LY 294002 (um inibidor de PI3K/Akt, 10 e 30  $\mu\text{M}$ ) e PD 98095 (um inibidor de MEK, 10 e 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). As células foram colhidas aos 0 e aos 20 minutos. Detectou-se fosfoERK, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-IKK $\alpha/\beta$ , 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 dadores 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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 polyclonal (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 ação 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 tumoriais 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 Nº 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 µM 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 hIgG<sub>1</sub> 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 mAcs 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 µg/ml, foram capturados à superfície modificada do biosensor durante 1,5 minutos a 10

$\mu$ l/min. Fez-se passar um fluxo de CD40-his recombinante solúvel sobre a superfície do biosensor a diversas concentrações. O anticorpo e o抗igenio 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 interacção/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	Ka (M-1 seg-1)	kd (seg-1)	KD (nM)
Anti-CD40, 5.9	(12,35±0,64) x 10 <sup>5</sup>	(15,0 ± 1,3) x 10 <sup>-3</sup>	12,15±0,35
Anti-CD40, CHIR-12.12	(2,41±0,13) x 10 <sup>5</sup>	(1,24 ± 0,06) x 10 <sup>-4</sup>	0,51± 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  $\mu$ g) 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  $\mu$ g/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.

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

Para definir com maior precisão o epitopo reconhecido pelo mAc CHIR-12.12, sintetizaram-se péptidos do Domínio Extracelular 2 de CD40, que corresponde à sequência PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT (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 <b>YCDPNL</b> (resíduos 78-87 da SEQ ID NO:10 ou 12)
19	QHK <b>YCDPNLG</b> (resíduos 79-88 da SEQ ID NO: 10 ou 12)
20	<b>HKYCDPNLGL</b> (resíduos 80-89 da SEQ ID NO:10 ou 12)
21	<b>KYCDPNLGLR</b> (resíduos 81-90 da SEQ ID NO:10 ou 12)
22	<b>YCDPNLGLRV</b> (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 interacção 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	<b>HKYCDPNLGL</b> (resíduos 80-89 da SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12)
21	<b>KYCDPNLGLR</b> (resíduos 81-90 da SEQ ID NO:10 ou SEQ ID NO:12)
22	<b>YCDPNLGLRV</b> (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 autoimmune (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 imunossupressores 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 sobreeexpressam 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 existe terapêutica de referência, então poderá delinearse 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 fisico-química de CHIR-12.12 é óptima 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 dissulfito. 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 cancros 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 fosfato 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 glicina, 150 mM cloreto de sódio	7,5	9,5
10 mM glicina, 150 mM cloreto de sódio	9,0	9,5

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

#### *Calorimetria Diferencial de Varriamento (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 Tosohas 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 Catiônica (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 acídicas 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 acídicas manifestam relativamente ao pH da solução. A amostra de controlo continha já um elevado grau de espécies acídicas (~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 acídicas do que o controlo. Em segundo lugar, a percentagem de espécies acídicas 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 acídicas				
	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 descriptivo e não com fins limitativos.

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Long, Li

Luqman, 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 ORGÃOS

<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	cgc	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	tcc	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 Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys 115 120 125 384			
gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro 130 135 140 432			
cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu 145 150 155 160 480			
ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp 165 170 175 528			
aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp 180 185 190 576			
agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aac Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys 195 200 205 624			
gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln 210 215 220 672			
ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys * 225 230 235 720			

<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 ggttttccctt gttgtatattt taagagggtgt ccagtgtcag 60  
 gtgcagttgg tggagtcctgg gggaggcggtg gtccagccctg ggagggtccct gagactctcc 120  
 tgtgcagccct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtcccg ccaggctcca 180  
 ggcaaggggc tggagttgggt ggcagttata tcataatgagg aaagtaataq ataccatgca 240  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac gctgtatctg 300  
 caaatgaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agatgggggt 360  
 atagcagcac ctgggctcga ctactggggc cagggaaaccc tggtcacccgt ctccctcaagca 420  
 agraccaagg gcccattccgt ctccccccctg ggcgcgccta gcaagagacac ctctgggggc 480  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tactttcccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcagggc ccctgaccag cggcgtgcac acctttcccg ctgttcttaca gtccctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagegt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacactac 660  
 atctgeaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaagggtgg acaagagaggt tggtgagagg 720  
 ccagcacagg gagggagggt gtctgtctgaa agccaggctc agcgttctcg ctggacgcg 780  
 tcccccgtat gcagtccctcag tccaggggcag caaggcaggc cccgttctgccc ttttcccccg 840  
 gagggcctctg cccggccccac tcatgtcag ggagagggtt ttctggctttt tttttccccaggc 900  
 tctggcagg cacaggctag gtggccctaa cccagggccctt gcaacacaaaag gggcagggtgc 960  
 tgggctcaga cctgccaaga gccatateccg ggaggacccctt gccccttgacc taagccacc 1020  
 ccaaaaggcaca aacttccac tccctcagct cggacacccctt ctcttccccc agattccagt 1080  
 aactcccaat ctcttctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc 1140  
 gtgcccagggt aaggccagccc aggccctcgcc ctccagctca aggcggggaca ggtgccctag 1200  
 agtageotgc atccaggggac agggccccagc cgggtgtctgaa caccgtccacc tccatcttt 1260  
 ctctcagcacc tgaacttctg gggggaccgt cagtttctt ctttttttttt aaaccccaagg 1320  
 acacccctcat gatctccccgg accccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg 1380  
 aagaccctgaa ggtaaagtcc aacttggtaag tggacccgggt ggagggtgcat aatgccaaga 1440  
 caaaaggcccg ggaggagccg tacaacagca cgttccgtgt ggtcagcgcc ctcaccgtcc 1500  
 tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcac ggttccaaac aaaggccctcc 1560  
 cagcccccat cgagaaaaacc atctccaaag cccaaagggtgg gacccgtggg gtgcgaggggc 1620  
 cacatggaca gagggccggct cggcccccacc tctgcctctgaa gagggtgaccgc tgttaccaacc 1680  
 tctgttccctt caggccggcc cccggaaacca cagggtgtaca ccctggcccccc atcccgggag 1740  
 gagatgacca agaaccagggt caggctgacc tgcctgtca aagggttcttta tccccagcgac 1800  
 atcccggtgg agtggggagag caatggggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 1860  
 gtgttggact ccgacggctc ctcttccctt tataacaaggc tccaccgtggaa caagagcagg 1920  
 tggcagccagg ggaacgtttt ctcatgtccctt gttgtatgttggaggcttgcaccaaccactac 1980  
 acgcagaaga gcttcccccgtt gttttttttt aaatgtaa 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 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 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 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 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

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

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<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			
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 tgc gag		336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr		
100	105	110
agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc		384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly		
115	120	125
ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag		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 tcg 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 cggt 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 gas 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 tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys 145	150	155	480
tgt cac cct tgg aca agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa cag Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln 165	170	175	528
gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg ctg Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu 180	185	190	576
aga gcc ctg gtg gtc atc ccc 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	720
gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta cat Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His 245	250	255	768
gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser 260	265	270	816
gtg cag gag aga cag tga Val Gln Glu Arg Gln *	275		834

<210> 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
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
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抗igeno 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抗igeno 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 comprehende 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 comprehende 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 Nº PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva.

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao抗ígeno 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抗ígeno 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抗ígeno 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抗ígeno 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 Nº 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 Nº PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que comprehende 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 comprehende 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抗原 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抗原 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 celiaca (enteropatia sensível ao glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoriase, 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, 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抗ígenio 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抗ígeno 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 Nº PTA-5543, num ensaio de ligação competitiva, e

e) um anticorpo monoclonal que corresponde a um fragmento de ligação ao抗原 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抗原 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抗原 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抗原 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 Nº 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 Nº PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que comprehende 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 comprehende 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抗原 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抗原 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 imunosupressor num excipiente farmaceuticamente aceitável.

**7.** O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com a Reivindicação N°.6, caracterizado por o agente imunosupressor 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抗原 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抗原 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 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.

**9.** O uso de uma quantidade eficaz de 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, 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 imunosupressor num excipiente farmaceuticamente aceitável.

**11.** O anticorpo monoclonal, ou o uso, de acordo com a Reivindicação N°.10, caracterizado por o agente imunosupressor 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 selecionado 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:

MALPAQLLGLLMWVGSSSG

variável:

DIVMTQSPLSLTVTPGEFASISCRSSQSLYSNGYNLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG  
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTDFPTFGPGTKVDIR

constante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYSLSSTLTSKADYEKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## FIGURA 1B

Cadeia pesada de CHIR-12.12:

leader:

MEPGLSWVFLVAILRGVQC

variável:

QVQLVESGGVVQFGRSLRLSCRAASGFTFSSYGMHWWVRQAFGKGLEWVAVISYERSNRYHAD  
SVKGRFTISRDNSKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTIVTVSS

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGL  
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHRPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPKLLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRREMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

região constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAAVLQSSGL  
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHRPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPKLLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRREMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## FIGURA 2A

Sequência de DNA da cadeia leve de CHIR-12.12:

**FIGURA 2B**

Sequência de DNA da cadeia pesada de CHIR-12.12 (incluindo introns):

## FIGURA 3A

### Cadeia leve de CHIR-5.9:

leader:

MALLAQQLLGLMLNLVPGSSG

variável:

AIVMTQPPPLSSPVTLGQDASISCRSSQSLVRSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRLSG  
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEAEDVGYYYCMQVTQFPHTFGQQGTRLZIK

constante:

RTVAAPSVFIPPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWVVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
DSTYSLSSTTLSKADYERHHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

## FIGURA 3B

### Cadeia pesada de CHIR-5.9:

leader:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variável:

EVQLVQSGAEVKPGESLKISCKGSGYSPSYWIGNVRQMPGKLEWMGIIYPGDSDTTRYSP  
SFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARGTAAGRDYYYYYGMWDVGQGTTTVVS  
S

constante:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGL  
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

região constante alternativa:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPABLQSSGL  
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVF  
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTPREEQYNSTYRVV  
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

## FIGURA 4A

Sequência codificante para a isoforma curta do CD40 humano:

1 atggtcgtc tgcccttgca gtgcgtcctc tggggctgtct tgctgaccgc tgccatcca  
61 gaaccaccca ctgcattgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcatgt ctgttttg  
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgtac tgccacagagt tcactgaaac ggaatgcctt  
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cttagacacc tggAACAGAG agacacactg ccaccaggcac  
241 aaatactgcg accccaaacctt agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaaacagac  
301 accatctgea ccttgtaaaga aggttgtgcac tgtacgatgt aggcctgtga gagttgtgtc  
361 ctgcacccgtt catgtcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgttacagg ggtttctgtat  
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaaatg tgcatcgtttttgcggaaaa  
481 tgtaccccit ggacaaggic cccaggatcg gctgagagcc ctgggggtga tccccatcat  
541 ctgcggatc ctgtttgttgc ttcctttgtt gctggctttt atcaaaaagg tggccaagaa  
601 gccaaccaat aa

## FIGURA 4B

Isoforma curta codificada do CD40 humano:

1 mvrlplqcvl wgelitavhp epptacrekq ylinsqcsl cqpgqklvsd cteftetecl  
61 pggesefldt wnrrethchqh kycdpnligr vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv  
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafeek chpwtrspgs aesprrorphh  
181 lrdpvcphlg aglyqkggqe anq

### **FIGURA 4C**

## Sequência codificante para a isoforma longa do CD40 humano:

1 atggttcgtc tgccctctgca gtgcgtcctc tggggctgtc tgctgaccgc tgccatcca  
61 gaaccaccca ctgcattgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcatgt ctgttcttg  
121 tgccagccag gacagaaact ggttagtgcac tgccacagagt tcactgaaac ggaatgcctt  
181 ccttgggtt aasgegaatt cctagacacc tggAACAGAG agacacacig ccaccagcac  
241 aaatactgcg accccaaacct agggttcgg gtcCAGCAGA agggcaccc tc agaaacagac  
301 accatctgca ctgtgaaga aggctggcact tgtaCGAGTG aggctgtga gagctgtgc  
361 ctgcaccgcct cttgtcgcc cggctttggg gtcaaggcaga ttgttacagg ggtttctgt  
421 accatctgcg aggccctgcctc agtgcggcttc ttcccaatgt tgtaCATTGCT ttccggaaaa  
481 tgtaCCCTT ggacaagctg tgagacccaa gacctggtt tgcaacaggc aggccacaaac  
541 aagacttgtat ttgttgtgg tccccaggat cggctgagag ccctgggtt gatccccatc  
601 atcttggga tccctgttgc catccctcttgc gtgcgtgtt tttatcaaaaaa ggtggccaaag  
661 aagccaaacca afaaggcccc ccaccccaag cagggaaaaaggaggatcaa ttttcccgac  
721 gatcttccctg gtcccaacac tgctgtccca gtgcaggaga ctttacatgg atgccaacccg  
781 gtcacccagg aggatgtccaa agagatgcgc atctcagttcc agggagagaca giga

#### **FIGURA 4D**

Isoforma longa codificada do CD40 humano:

1 mvrplqcvl wgcrltvhp epptacrekq yllnsqcsl cqpgqklvsd ctefetec  
61 pegesefldt wrrethchqh kycdpnlgir vqqkgtsed ticiceegwh ctseacesov  
121 lhrscspgfg vkqiavgsd ticepcpvgf fsvvssafe k chpwtscetk dlvvqqagin  
181 ktdvvvcpqd riraivvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd  
241 dpgsntaaap vqetlhgcqp vtgedkesr isvqerg

**FIGURA 5**

