

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

(21) **PI0618208-9 A2**

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



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/395 2006.01
C12Q 1/68 2006.01

(54) Título: **USO DE ANTICORPOS ANTI-CD40**

(30) Prioridade Unionista: 01/11/2005 US 60/732.730

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

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

(74) Procurador(es): ORLANDO DE SOUZA

(86) Pedido Internacional: PCT US2006042929 de 01/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/053767 de 10/05/2007

(57) **Resumo:** USO DE ANTICORPOS ANTI-CD40 Métodos para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 são fornecidos, em que o paciente humano é heterozigático ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Também são fornecidos métodos de inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano que é heterozigático ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Os métodos compreendendo a administração ao paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Métodos e kits para a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que é tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), bem como métodos e kits para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), também são fornecidos. Os métodos da presente invenção têm uso no tratamento de cânceres e condições pré-malignas que são associadas a células que expressam CD40. Esses métodos são particularmente vantajosos com relação a cânceres e condições pré-malignas que são associadas a células que expressam tanto CD40 quanto CD20, uma vez que os métodos permitem o tratamento de pacientes que têm câncer ou condição pré-maligna que é refratário à terapia com outros agentes oncoterapêuticos como anticorpos anti-CD20.

USO DE ANTICORPOS ANTI-CD40

Esta invenção relaciona-se a novos usos de anticorpos anti-CD40, em particular no tratamento de cânceres e condições pré-malignas que são associadas com células que expressam CD40.

Fundamento da invenção

Vários membros da família de fator de necrose tumoral (TNF) de ligantes e seus receptores correspondentes regulam o crescimento de células normais por indução de apoptose ou aumento da sobrevivência e proliferação celulares. É esse equilíbrio entre sinais apoptóticos e sinais de sobrevivência e proliferação que mantém a homeostasia celular normal. Pelo menos 26 receptores da família de TNF e 18 ligantes da família de TNF foram identificados até hoje. As formas biologicamente ativas de ambos os receptores e ligantes são trímeros de proteínas auto-montadas. Transmembrana e formas solúveis dos receptores e ligantes foram identificadas. Embora os domínios intracelulares dos receptores não partilhem homologia de seqüência, seus domínios extracelulares compreendem 40 repetições de aminoácidos, ricas em cisteína. Seus sinais de caudas citoplasmáticas por interação com dois grupos principais de proteínas intracelulares: fatores associados a receptor de TNF (TRAFs) e proteínas que contêm domínios de morte (DD). A interação entre pelo menos seis TRAFs humanos e sítios de ligação de TRAF na cauda citoplasmática de alguns desses receptores inicia várias vias de sinalização, que incluem AKT (a serina/treonina quinase referida como proteína quinase B ou PKB), fator-KB nuclear (NF-KB), e proteína quinases ativadas por mitógeno (MAPK).

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

O membro de receptor da família de TNF CD40 é um antígeno de superfície celular de 50-55 kDa presente na
5 superfície de células B humanas normais e neoplásicas, células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T CD8⁺, células endoteliais, e células monocíticas e epiteliais, e vários tumores sólidos, que incluem câncer de pulmão, mama, ovário, bexiga urinária e cólon. A ligação do ligante de
10 CD40 (CD40L) ao antígeno de CD40 na membrana de célula B fornece um sinal co-estimulante positivo que estimula a ativação e proliferação da células B, resultando na maturação da célula B em célula plasmática que secreta altos níveis de imunoglobulina solúvel. CD40 ativa TRAF-2,
15 -3, -5 e -6, que supra-regulam diversas vias de sinalização após encaixe de CD40 com CD40L (seja CD40L ligado a membrana ou CD40L solúvel), incluindo quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase amino terminal c-jun (JNK), proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK),
20 AKT e NF-KB (veja, por exemplo, Younes e Carbone (1999) *Int. J. Biol. Markers* 14:135-143; van Kooten and Banchereau (2000) *J. Leukoc. Biol.* 67:2-17).

Células B malignas de todos os tipos de tumor de linhagem de células B expressam CD40 e parecem depender da
25 sinalização de CD40 para sobrevivência e proliferação. Células transformadas de pacientes com linfomas de células B de baixo e alto grau, leucemia linfoblástica aguda de célula B, mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crônica, Macroglobulinemia de Walsdenstrom, e doença de Hodgkin
30 expressam CD40. A expressão de CD40 é também detectada em

leucemia mieloblástica aguda e 50% de linfomas relacionados à AIDS.

Inúmeros carcinomas e sarcomas também exibem altos níveis de expressão de CD40, embora o papel da sinalização de CD40 nessas células cancerosas seja bem menos compreendido. Carcinomas que expressam CD40 incluem carcinoma de bexiga urinária (Paulie e cols. (1989) J Immunol. 142:590-595; Braesch-Andersen e cols. (1989) J Immunol. 142:562-567), carcinoma de mama (Hirano e cols. (1999) Blood 93:2999-3007; Wingett e cols. (1998) Breast Cancer Res. Treat. 50:27-36); câncer de próstata (Rokhlin e cols. (1997) Cancer Res. 57:1758-1768), carcinoma de célula renal (Kluth e cols. (1997) Cancer Res. 57:891-899), carcinoma do nasofaringe não diferenciado (LTNPC) (Agathangelou e cols. (1995) Am. J Pathol. 147:1152-1160), carcinoma de célula escamosa (SCC) (Amo e cols. (2000) Eur. J. Dermatol. 10:438-442; Posner e cols. (1999) Clin. Cancer Res. 5:2261-2270), carcinoma papilar da tireóide (Smith e cols. (1999) Thyroid 9:749-755), melanoma cutâneo maligno (van den Oord e cols. (1996) Am. J. Pathol. 149:1953-1961), carcinoma gástrico (Yamaguchi e cols. (2003) Int. J Oncol. 23(6):1697-702), e carcinoma hepático (veja, por exemplo, Sugimoto e cols. (1999) Hepatology 30(4):920-26, que discute carcinoma hepatocelular humano). Para sarcomas que expressam CD40, veja, por exemplo, Lollini e cols. (1998) Clin. Cancer Res. 4(8):1843-849, que discute osteossarcoma humano e sarcoma de Ewing.

A sinalização de CD40 protege células B imaturas e linfomas de célula B de apoptose induzida por IgM ou Fas (veja, por exemplo, Wang e cols. (1995) J. Immunol.

155:3722-3725). Células de linfoma de célula do manto expressam um alto nível de CD40, e a adição de ligante de CD40 exógeno mostrou melhorar sua sobrevivência e recuperação da apoptose induzida por fludarabina (Clodi e cols. (1998) *Brit. J. Haematol.* 103:217-219). O papel da sinalização de CD40 sobre a sobrevivência e proliferação de células B malignas torna o antígeno CD40 um alvo potencial para a terapia anticâncer. De fato, anticorpos anti-CD40 antagonistas inibem a proliferação e/ou diferenciação de células B malignas humanas *in vitro* (veja, por exemplo, Publicação de Pedido de Patente U.S. No. 20040109857). Além disso, modelos de murídeo de linfomas humanos agressivos demonstram a eficácia *in vivo* de anticorpos anti-CD40 na promoção da sobrevivência animal. Veja, por exemplo, Funakoshi e cols. (1994) *Blood* 83:2787- 2794; Tutt e cols. (1998) *J. Immunol.* 161:3176-3185; e Szocinski e cols. (2002) *Blood* 100: 217-223.

O ligante CD40 (CD40L), também conhecido como CD154, é uma proteína de transmembrana de 32-33 kDa que também existe em duas formas solúveis menores biologicamente ativas, de 18 kDa e 31 kDa, respectivamente (Graf e cols. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749- 1754; Mazzei e cols. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle e cols. (1996) *J. Biol. Chem.* 271:5965-5967). CD40L é expresso em células T-helper CD4+ ativadas, mas não em repouso (Lane e cols. (1992) *Eur. J. Immunol.* 22:2573-2578; Spriggs e cols. (1992) *J. Exp. Med.* 176:1543-1550; e Roy e cols. (1993) *J. Immunol.* 151:1-14). Tanto CD40 quanto CD40L foram clonados e caracterizados (Stamenkovi e cols. (1989) *EMBO J.* 8:1403-1410; Armitage e cols. (1992) *Nature* 357:80-82; Lederman e

cols. (1992) *J. Exp. Med.* 175:1091-1101; e Hollenbaugh e cols. (1992) *EMBO J.* 11:4313-4321). Veja também Patente U.S. No. 5.945.513, que descreve CD40L humano. Células transfectadas com o gene de CD40L e que expressam a

5 proteína de CD40L em sua superfície podem despertar a proliferação de células B, e, junto com outros sinais estimulatórios, podem induzir a produção de anticorpo (Armitage e cols. (1992) supra; e Patente U.S. No. 5.945.513). Pacientes com malignidades linfóides, doenças

10 autoimunes, doença cardiovascular e trombocitemia essencial têm níveis séricos elevados de CD40L solúvel (sCD40L) que não são observados em indivíduos saudáveis. A expressão constitutiva de CD40L foi observada em um subconjunto de pacientes com várias malignidades linfóides de células B,

15 incluindo linfoma de célula do manto, linfoma folicular, linfoma da zona marginal, leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma de células B grande difuso (DLBCL), linfoma folicular (FL), e linfoma de célula B infectada por HIV.

Veja, por exemplo, Clodi e cols. (1998) *Br. J. Haematol.* 103:270-275; Schaffner e cols. (1998) *Blood* 91:2689-2697; Moses e cols. (1997) *Nat. Med.* 3:1242-1249; Trentin e cols. (1997) *Cancer Res.* 57:4940-4947; e Pham e cols. (2002) *Immunity* 16:37-50). CD40L pode ter um papel importante na interação dependente de contato de célula de

25 células B tumorais que expressam CD40 nos folículos neoplásicos ou células de Reed-Sternberg que expressam CD40 em áreas de doença de Hodgkin (Carbone e cols. (1995) *Am. J. Pathol.* 147:912-922). No entanto, o mecanismo de sinalização de CD40 mediada por CD40L que leva a respostas

30 de sobrevivência versus morte celular de células B malignas

não é completamente conhecido. Por exemplo, em células de linfoma folicular, a infra-regulação de molécula TRAIL que induz apoptose (APO-2L) (Ribeiro e cols. (1998) British J. Haematol. 103:684-689) e super-expressão de bcl-2, e no
5 caso de B-CLL, infra-regulação de CD95 (Fas/APO-1) (Laytragoon-Lewin e cols. (1998) Eur. J. Haematol. 61:266-271) foram propostas como mecanismos de sobrevivência. Em contraste, evidência em linfoma folicular indica que a ativação de CD40 leva à supra-regulação de TNF (Worm e
10 cols. (1994) International Immunol. 6:1883-1890) e moléculas de CD95 (Plumas e cols. (1998) Blood 91:2875-2885).

Anticorpos monoclonais humanos anti-CD40 e inúmeros usos destes são revelados em Pedidos de Patentes de co-
15 propriedade publicados como WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 e WO 2005/044294. Aqueles pedidos revelam especificamente um anticorpo monoclonal anti-CD40 IgG1 humano, designado como CHIR-12.12, que foi gerado por
20 imunização de camundongos transgênicos que sustentam o locus de cadeia pesada de IgG1 humana e o locus de cadeia leve κ humana (XenoCamundongo^o technology; Abgenix, California).

Como mostrado por análise FACS, CHIR-12.12 se liga
25 especificamente a CD40 humano e pode evitar ligação CD40-ligante (CD40L). CHIR-12.12 pode competir por CD40L pré-ligado a CD40 de superfície celular. O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 é um forte antagonista e inibe proliferação *in vitro* mediada por CD40L de células B normais e malignas. O
30 anticorpo monoclonal CHIR-12.12 inibe diretamente a

sobrevivência e as vias de sinalização mediadas por CD40L em linfócitos B humanos normais. *In vitro*, CHIR-12.12 mata células cancerosas primárias de pacientes com NHL (linfoma não Hodgkin) por ADCC. A atividade antitumor dose-
 5 dependente foi observada em um modelo de linfoma humano de xenoenxerto. CHIR-12.12 está atualmente em experimentos de fase I para malignidades de célula B.

CD20 é um antígeno de superfície celular expresso precocemente em diferenciação de célula B e permanece na
 10 superfície celular através do desenvolvimento da célula B. CD20 está envolvido na ativação de célula B, é expresso em níveis muito altos em células B neoplásicas, e é um alvo terapêutico clinicamente reconhecido (veja, por exemplo, Hooijberg e cols. (1995) *Cancer Research* 55: 2627).
 15 Anticorpos que visam CD20, como rituximab (Rituxan®), foram aprovados pela "U.S. Food and Drug Administração" para o tratamento de linfoma não Hodgkin (veja, por exemplo, Boye e cols. (2003) *Ann. Oncol.* 14:520). Rituxan provou ser um tratamento eficaz para linfoma não Hodgkin (NHL) de grau
 20 baixo, intermediário e alto (NHL) e ativo em outras malignidades de células B (veja, por exemplo, Maloney e cols. (1994) *Blood* 84:2457-2466), McLaughlin e cols. (1998) *J. Clin. Oncol.* 16:2825-2833, Maloney e cols. (1997) *Blood* 90:2188-2195, Hainsworth e cols. (2000) *Blood* 95:3052-3056,
 25 Colombat e cols. (2001) *Blood* 97:101-106, Coiffier e cols. (1998) *Blood* 92:1927-1932), Foran e cols. (2000) *J. Clin. Oncol.* 18:317-324, Anderson e cols. (1997) *Biochem. Soc. Trans.* 25:705-708, ou Vose e cols. (1999) *Ann. Oncol.* 10:58a).

30 Embora o mecanismo exato de ação não seja conhecido, a

evidência indica que os efeitos antilinfoma de Rituxan® são em parte devidos à citotoxicidade mediada por complemento (CMC), citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), inibição de proliferação celular, e finalmente indução direta de apoptose. ADCc é um mecanismo de ação principal para vários anticorpos monoclonais comercializados e em pesquisa. Alguns pacientes, no entanto, tornam-se resistentes ao tratamento com Rituxan® (veja Witzig e cols. (2002) *J Clin. Oncol.* 20:3262, Grillo-Lopez e cols. (1998) *J Clin. Oncol.* 16:2825, ou Jazirehi e cols. (2003) *Mol. Cancer Ther.* 2:1183-1193). Por exemplo, alguns pacientes perdem expressão de CD20 em células B malignas após terapia com anticorpo anti-CD20 (Davis e cols. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:611). Além disso, 30% a 50% dos pacientes com NHL de baixo grau não exibem resposta clínica a esse anticorpo monoclonal (Hainsworth e cols. (2000) *Blood* 95:3052-3056; Colombat e cols. (2001) *Blood* 97:101-106). A atividade clínica de rituximab em NHL também mostrou ser correlacionada com o genótipo de FcγRIIIa do paciente. Pacientes com o polimorfismo 158aa de FcγRIIIa de V/V ou V/F são mais responsivos a rituximab que aqueles com F/F (por exemplo, veja, Cartron e cols. (2002) *Blood* 99(3):754-758 ou Dall'Ozzo e cols. (2004) *Cancer Res.* 64:4664-4669). Para pacientes que desenvolvem resistência a esse anticorpo monoclonal, ou que têm um linfoma de célula B que é resistente à terapia inicial com esse anticorpo, formas alternativas de intervenção terapêutica são necessárias.

Há, portanto, uma necessidade continuada por novos agentes terapêuticos e novas estratégias terapêuticas para

cânceres e condições pré-malignas. Em particular, há uma necessidade por novas estratégias terapêuticas para o tratamento de pacientes que são homozigóticos ou heterozigóticos para FcγRIIIa-158F e são refratários ao
5 tratamento com anticorpos anti-CD20, como rituximab (Rituxan®). Além disso, um anticorpo que pode matar células malignas sem necessitar de um conjugado resultará em um medicamento que é de menor custo e que pode ter menos efeitos colaterais.

10 Breve sumário da invenção

São fornecidos métodos para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, em que o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para
15 FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Os métodos compreendem a administração ao paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. A invenção também fornece o uso de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de
20 um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o tratamento de um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa 158F (genótipo V/F ou F/F).

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

um anticorpo anti-CD40 na manufatura de um medicamento para inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa158F (V/F ou F/F).

5 Métodos e kits para a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que é tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®) são também fornecidos. Em algumas modalidades, os métodos compreendem: a) a identificação de
10 um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®); e b) a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 do paciente humano (VN, V/F ou F/F); em que o paciente com câncer ou condição
15 pré-maligna é tratável com um anticorpo anti-CD40 se o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158 (genótipo V/F ou F/F). A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma quantidade
20 terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Kits da presente invenção que fornecem a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que é tratável com um anticorpo anti-CD40 compreendem reagentes para a determinação de um
25 genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

A invenção também fornece métodos e kits para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que é refratário ao tratamento com rituximab
30 (Rituxan®). Em algumas modalidades, os métodos compreendem:

a) a identificação de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®); e b) determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano (V/V, V/F ou F/F); em que, se o paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento do câncer ou condição pré-maligna. A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Kits da presente invenção que fornecem a seleção de uma terapia de anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD40 compreendem reagentes para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

A presente invenção também fornece métodos para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, em que os métodos compreendem a administração ao paciente humano de um anticorpo de internalização lenta. Em uma tal modalidade, uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 é administrada ao paciente humano de modo que o anticorpo anti-CD40 não seja significativamente internalizado por células que expressam CD40 após sua administração. Em uma outra tal modalidade, uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40 é

administrada ao paciente humano de modo que o anticorpo anti-CD40 permaneça substancialmente uniformemente distribuído na superfície de células que expressam CD40 após sua administração. Ainda em uma outra modalidade, um anticorpo anti-CD40 é administrado ao paciente humano de modo que uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 esteja presente na superfície de células que expressam CD40 no paciente humano após sua administração.

Anticorpos anti-CD40 para uso de acordo com a presente invenção se ligam especificamente ao antígeno de CD40. Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular, anticorpos monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por FcγRIIIa-158V humano, uma forte afinidade de ligação por FcγRIIIa-158F humano, uma forte afinidade de ligação por FcγRIIIa-158V e FcγRIIIa-158F humano. Em algumas dessas modalidades, os anticorpos anti-CD40 podem se ligar a qualquer um dos dois alótipos de aminoácido 158 de FcγRIIIa (V ou F) em células natural killer (NK) de um paciente humano com características de ligação que são adequadas para causar potente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Anticorpos anti-CD40 adequados incluem, mas não são limitados a, anticorpos anti-CD40 que são livres de significativa atividade agonista, incluindo, por exemplo, anticorpos anti-CD40 que são um antagonista de sinalização CD40-CD40L em células que expressam CD40. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é selecionado do grupo que consiste em: a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12; b) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de

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

CD40 humano.

Os métodos da presente invenção têm uso no tratamento de cânceres e condições pré-malignas que são associadas com células que expressam CD40. Exemplos incluem, sem
5 limitação, cânceres da linhagem de célula B, malignidades hematológicas de célula na B, por exemplo, leucemia mielocítica aguda, tumores sólidos, e cânceres ou condições pré-malignas que são associadas com células que expressam CD20. Os métodos da invenção são particularmente vantajosos
10 com relação a cânceres e condições pré-malignas que são associadas com células que expressam CD40 e CD20. Desse modo, a presente invenção permite o tratamento de pacientes que têm um câncer ou condição pré-maligna que é refratária à terapia com outros agentes oncoterapêuticos, incluindo
15 anticorpos anti-CD20 para pacientes que são homozigóticos ou heterozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F).

Breve descrição dos desenhos

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

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

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

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

Figura 5 mostra os resultados de quantificação de
30 expressão em superfície de célula CD40 e CD20 em células de

pacientes com CLL e células B normais.

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

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

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

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

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

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

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

Figura 13 é um gráfico em barra que mostra a potência
25 de ADCC (ED₅₀) de CHIR-12.12 ou rituximab sobre células Daudi por células efetoras NK purificadas de doadores com diferentes genótipos de FcγRIIIa.

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

genótipos.

Descrição detalhada da invenção

Os inventores descobriram, de forma surpreendente, que os anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, são capazes de
5 mediar potente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células alvo que expressam CD40 sob condições em que outros anticorpos que medeiam ADCC são menos eficazes ou relativamente ineficazes. Ao contrário de outros anticorpos, como rituximab (Rituxan®), anticorpos
10 anti-CD40 usados de acordo com a invenção podem se ligar a qualquer um dos dois alótipos de aminoácido 158 de FcγRIIIa (V ou F) em células natural killer (NK) de paciente humano com características de ligação que são adequadas para causar potente ADCC. Esse achado é inesperado e representa
15 um avanço em nossa capacidade para tratar cânceres e condições pré-malignas por toda uma seção de um paciente.

Portanto, anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, podem ser usados no tratamento de cânceres e condições pré-malignas associadas com células que expressam CD-40 em
20 pacientes humanos heterozigóticos ou homozigóticos para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), além de pacientes humanos homozigóticos para FcγRIIIa-158V (genótipo V/V).

A invenção assim fornece um método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, em
25 que o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapeuticamente ou
30 profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. A

invenção também fornece o uso de uma quantidade
terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo
anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o tratamento
de um câncer ou condição pré-maligna que está associada a
5 células que expressam CD40 em um paciente humano
heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa 158F (genótipo
V/F ou F/F).

Como acima observado, a atividade clínica de rituximab
em NHL mostrou estar correlacionada com o genótipo de
10 FcγRIIIa do paciente. Pacientes com o polimorfismo de 158aa
de FcγRIIIa de F/F são menos responsivos a rituximab que
aqueles com V/V ou V/F (por exemplo, veja, Cartron e cols.
(2002) *Blood* 99(3):754-758 ou Dall'Ozzo e cols. (2004)
Cancer Res. 64:4664-4669. Portanto, a presente invenção é
15 vantajosa para o tratamento de cânceres e condições pré-
malignas que não são responsivas ao tratamento com um
anticorpo anti-CD20 como rituximab (Rituxan®).

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

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

manufatura de um medicamento para inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (V/F ou F/F).

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

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

A invenção fornece um método para a identificação de um paciente humano com câncer ou condição pré-maligna
15 tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®), que compreende:

a) a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 e que é refratário ao tratamento com
20 rituximab (Rituxan®);

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

em que o referido câncer ou condição pré-maligna é tratável com um anticorpo anti-CD40 se o referido paciente
25 humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa158F (genótipo V/F ou F/F). A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano identificado com o uso desse método de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

30 Esse método de identificação de um paciente humano com

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

A invenção também fornece um método para seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®), que compreende:

a) a identificação de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®); e

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

em que, se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento do referido câncer ou condição pré-maligna. Em particular, um anticorpo anti-CD40 pode ser selecionado em preferência ao tratamento com rituximab (Rituxan®). A invenção também pode incluir a etapa de administração a um paciente humano

identificado com o uso desse método de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

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

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

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

FcγRIIIa em células natural killer (NK).

Portanto, a invenção fornece um método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo que o anticorpo anti-CD40 não seja significativamente internalizado por células que expressam CD40 após a administração.

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

A invenção também fornece um método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de um anticorpo anti-CD40, de modo que uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 esteja presente na superfície de células que expressam CD40 no referido paciente humano após a administração.

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

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

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

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

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

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

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

Abreviações padrão para nucleotídeos e aminoácidos são usadas nessa especificação.

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

imunologia, que estão dentro da habilidade daqueles que trabalham na técnica.

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

Os métodos da invenção envolvem o uso de anticorpos anti-CD40 no tratamento de cânceres e condições pré-malignas associadas com células que expressam CD40.

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

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

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

5 Como apontado em outra parte nesta especificação, CD40 é encontrado na superfície de células B humanas normais e neoplásicas, células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T CD8+, células endoteliais, células monocíticas e epiteliais, e vários tumores sólidos, incluindo tumor de
10 pulmão, mama, ovário, bexiga urinária, e cânceres de cólon. Células b malignas de tipos de tumor de linhagem de células B expressam CD40 e parecem depender da sinalização de CD40 para sobrevivência e proliferação. Células transformadas de pacientes com linfomas de células B de baixo e alto grau,
15 leucemia linfoblástica aguda de célula B, mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crônica, Macroglobulinemia de Walsdenstrom, e doença de Hodgkin expressam CD40. A expressão de CD40 é também detectada em leucemia mieloblástica aguda e 50% de linfomas relacionados à AIDS.
20 Inúmeros carcinomas e sarcomas também exibem altos níveis de expressão de CD40, embora o papel da sinalização de CD40 nessas células cancerosas seja bem menos compreendido. Carcinomas que expressam CD40 incluem carcinoma de bexiga urinária, carcinoma de mama, câncer de próstata, carcinoma
25 de célula renal, carcinoma do nasofaringe não diferenciado (UNPC), carcinoma de célula escamosa (SCC), carcinoma papilar da tireóide, melanoma cutâneo maligno, carcinoma gástrico, e carcinoma hepático.

 Por "células que expressam CD40" entende-se qualquer
30 tipo de célula normal ou maligna que expresse níveis

detectáveis do antígeno CD40. Preferivelmente, as células que expressam CD40 são células que expressam níveis detectáveis de antígeno CD40 de superfície celular. Métodos para a detecção da expressão de CD40 em células são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, técnicas de PCR, imunistoquímica, citometria de fluxo, *Western blot*, ELISA, e outros. Esses métodos permitem a detecção de mRNA de CD40, antígeno CD40 e antígeno CD40 de superfície celular. A detecção de expressão de CD40 de superfície celular pode ser realizada como descrito no Exemplo 3 nesta especificação, ou por outros métodos adequados.

A célula maligna pode ser uma célula B maligna. Por "célula B maligna" entende-se qualquer célula B neoplásica, incluindo, sem limitação, células B derivadas de linfomas que incluem linfomas de célula B de grau baixo, linfomas imunoblásticos, linfomas não Hodgkin, doença de Hodgkin, linfomas induzidos por vírus Epstein-Barr (EBV), e linfomas relacionados à AIDS, bem como leucemias linfoblásticas agudas de célula B, mielomas, leucemias linfocíticas crônicas e outros.

Por "ligante de CD40" ou "CD40L", entende-se primariamente a proteína de transmembrana de 32-33 kDa que também existe em duas formas menores solúveis biologicamente ativas, de 18 kDa e 31 kDa, respectivamente (Graf e cols. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1749- 1754; Mazzei e cols. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:7025-7028; Pietravalle e cols. (1996) *J Biol. Chem.* 271:5965-5967). CD40L humano é também conhecido como CD154 ou gp39. Por "ligante de CD40" ou "CD40L", também se entende qualquer outro peptídeo, polipeptídeo ou proteína que possa ligar e ativar uma ou

mais vias de sinalização de CD40. Portanto, "ligantes de CD40" incluem, sem limitação, proteínas de ligante de CD40 de comprimento total e variantes e fragmentos destas que retêm suficiente atividade para realizar a função de
5 ligação e estímulo da sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Modificações a um ligante de CD40 nativo, por exemplo, CD40L humano, incluem, sem limitação, substituições, deleções, truncações, extensões, proteínas de fusão, fragmentos, peptidomiméticos e outros.

10 Por "sinalização de CD40", entende-se qualquer uma das atividades biológicas que resultam da interação de CD40 de superfície celular com um ligante de CD40 ou outro agonista, como um anticorpo agonista. Exemplos de sinalização de CD40 são sinais que levam à proliferação e
15 sobrevivência de células que expressam CD40, e estímulo de uma ou mais vias de sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Uma "via de sinalização de CD40" ou "via de transdução de sinal" deve significar pelo menos uma reação bioquímica, ou um grupo de reações bioquímicas, que
20 resultam de interação do receptor de CD40 com um ligante de CD40, por exemplo, CD40L, e que geram um sinal que, quando transmitido através da via de sinal, leva à ativação de uma ou mais moléculas abaixo na cascata de sinalização. As vias de transdução de sinal envolvem inúmeras moléculas de
25 transdução de sinal que levam à transmissão de um sinal do receptor de CD40 de superfície celular por toda a membrana plasmática de uma célula, e através de uma ou mais em uma série de moléculas de transdução de sinal, através do citoplasma da célula, e, em alguns casos, no núcleo da
30 célula. De interesse particular para a presente invenção

são vias de transdução de sinal de CD40, que incluem a via de sinalização de AKT, que leva à ativação de AKT, e finalmente à ativação de NF- κ B por meio da via de sinalização de NF- κ B; e proteína quinase ativada por vias de sinalização de mitógeno (MAPK), incluindo a via de sinalização de MEK/ERK e a via de sinalização de MEK/p38, que levam à ativação de ERK e p38, respectivamente.

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

Por "paciente humano", entende-se um paciente humano que é atingido, tem risco de desenvolver, ou está em recaída de qualquer câncer ou condição pré-maligna que está associada com células que expressam CD40.

Por "câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD40", entende-se qualquer um dos cânceres de linhagem de célula B, malignidades hematológicas de célula não B e tumores sólidos que são conhecidos por estarem associados com células que expressam CD40.

Os métodos da invenção são úteis no tratamento terapêutico de cânceres de linhagem de células B. Os cânceres de linhagem de células B que são associados com células que expressam CD40 incluem, sem limitação, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica

(CLL), leucemia pró-linfocítica (PLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), leucemia de célula pilosa, doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, e os linfomas, que
5 incluem, sem limitação, linfoma linfocítico pequeno difuso, folicular, DLBCL, linfoma de tecido linfóide associado à mucosa, linfoma de célula B monocitóide, linfoma esplênico, granulomatose linfomatóide, linfomatose intravascular, linfoma imunoblástico, linfoma relacionado à AIDS, e
10 outros.

Portanto, os métodos da invenção têm uso no tratamento de indivíduos que têm linfomas não Hodgkin relacionados à proliferação ou acúmulo anormal, incontrollável, de células B. Para as finalidades da presente invenção, tais linfomas
15 serão denominados de acordo com o esquema de classificação de *Working Formulation*, que é aquele de linfomas de células B categorizados como de grau baixo, grau intermediário e grau elevado (veja "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project", (1982) *Cancer* 49:2.112-2135).
20 Desse modo, linfomas de célula B de grau baixo incluem linfoma linfocítico de célula pequena, linfoma folicular de célula pequena clivada e linfoma folicular misto de célula pequena clivada e de célula grande; linfomas de grau intermediário incluem linfoma folicular de célula grande,
25 linfoma difuso de célula pequena clivada, linfoma difuso misto de célula pequena e grande e linfoma difuso de célula grande; e linfomas de grau elevado incluem linfoma imunoblástico de célula grande, linfoma linfoblástico e linfoma de célula pequena não clivada do tipo de Burkitt e
30 não Burkitt.

Os métodos da invenção são úteis no tratamento terapêutico de linfomas de célula B que são classificados de acordo com o sistema "Revised European and American Linfoma Classification (REAL)". Tais linfomas de célula B incluem, mas não são limitados a, linfomas classificados como neoplasias de célula B precursora, como leucemia/linfoma linfoblástico B; neoplasmas de células B periféricas, incluindo leucemia linfocítica crônica/linfoma linfocítico pequeno de células B, linfoma linfoplasmacitóide/imunocitoma, linfoma de célula do manto (MCL), linfoma do centro do folículo (folicular) (incluindo linfoma difuso de célula pequena, linfoma difuso misto de célula pequena e grande e linfoma difuso de célula grande), linfoma de célula B da zona marginal (incluindo os tipos extranodal, nodal e esplênico), plasmacitoma/mieloma, linfoma difuso de célula grande de células B do subtipo mediastínico primário (tímico), linfoma de Burkitt, e linfoma de células B de grau elevado Burkitt-like; e linfoma de células B não classificáveis de graus baixos ou elevados.

Os métodos da invenção são úteis no tratamento terapêutico da condição pré-maligna conhecida como MGUS (gamopatia monoclonal de significância indeterminada). Aproximadamente 25% dos pacientes com MGUS desenvolvem mieloma múltiplo (MM) ou um distúrbio de células plasmáticas relacionado (Kyle (1993) Mayo Clinic. Proc. 68:26-36). A proliferação de células plasmáticas malignas na medula óssea, detecção de uma proteína monoclonal da urina ou sérica (proteína M), anemia, hipercalcemia, insuficiência renal, e lesões ósseas líticas são

manifestações clínicas de MM, enquanto MGUS é clinicamente reconhecido como a presença de proteína M no soro ou urina sem outras característica clínicas de MM (veja, por exemplo, Kyle e Lust (1989) Semin. Hematol. 26:176-200; 5 Greipp e Lust Stem Cells (1995) 13:10-21). Pacientes com MGUS são assintomáticos e têm medições estáveis de proteína M (Kyle (1993) Mayo Clinic. Proc. 68:26-36). Um vez que MGUS é identificado em um indivíduo, a terapia de manutenção com um anticorpo anti-CD40 adequado, por 10 exemplo, um anticorpo anti-CD40 antagonista, pode bloquear o desenvolvimento de mieloma múltiplo nesses pacientes.

Os métodos da presente invenção também são úteis para o tratamento terapêutico de malignidades hematológicas não relacionadas à célula B associadas com células que 15 expressam CD40, como leucemias mielocíticas agudas e outros.

Os métodos da presente invenção são também úteis para o tratamento terapêutico de tumores sólidos. Tumores sólidos que são associados com células que expressam CD40 20 incluem, sem limitação, câncer de ovário, pulmão (por exemplo, câncer de pulmão dos tipos de célula não pequena do carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de célula grande e câncer de pulmão de célula pequena), mama, cólon, rim (incluindo, por exemplo, 25 carcinomas de células renais), bexiga, fígado (incluindo, por exemplo, carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, próstata, nasofaríngeo, tireóide (por exemplo, carcinoma papilar da tireóide) e cânceres cutâneos como melanoma, e sarcomas (incluindo, por exemplo, 30 osteossarcomas e sarcomas de Ewing).

O câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD40 pode ser um câncer ou condição pré-maligna associada com um nível indesejável de sinalização de CD40 em células que expressam CD40, ou o câncer ou
5 condição pré-maligna deve ser apenas indiretamente associado com células que expressam CD40. por "um câncer ou condição pré-maligna associada com um nível indesejável de sinalização de CD40" entende-se um câncer ou condição pré-maligna cujo desenvolvimento ou progressão é associada com
10 um nível indesejável de sinalização de CD40.

Por "um nível indesejável de sinalização de CD40", entende-se qualquer nível fisiologicamente indesejável de sinalização de CD40 que pode ocorrer em células que expressam CD40 em um paciente humano que tem um câncer ou
15 condição pré-maligna.

O câncer ou condição pré-maligna pode ser um a câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD20. Tais cânceres ou condições pré-malignas incluem, sem limitação, as malignidades de célula B aqui mencionadas.

20 A presente invenção é particularmente vantajosa em relação a cânceres e condições pré-malignas que são associadas com células que expressam CD40 e CD20, porque os novos usos de anticorpos anti-CD40, como, CHIR-12.12, aqui revelado, discute problemas associados ao uso de anticorpos
25 anti-CD20, como Rituxan®. Em particular, a presente invenção permite o tratamento de pacientes que têm um câncer ou condição pré-maligna que é refratária à terapia com outros agentes oncoterapêuticos, incluindo anticorpos anti-CD20, como Rituxan® para pacientes que são
30 homozigóticos ou heterozigóticos para FcγRIIIa-158F

(genótipo V/F ou F/F), como descrito em maiores detalhes nessa.

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

Por "resposta terapêutica positiva", com relação a um câncer ou condição pré-maligna, entende-se uma melhora no câncer ou condição pré-maligna em associação à atividade
10 terapêutica do anticorpo anti-CD-40, e/ou uma melhora nos sintomas associados ao câncer ou condição pré-maligna. Ou seja, pode ser observado um efeito anti-proliferativo, a prevenção de crescimentos adicionais de tumores, redução no tamanho do tumor, uma redução no número de células
15 cancerosas, e/ou uma diminuição em um ou mais dos sintomas associados com células que expressam CD40. Portanto, por exemplo, uma resposta terapêutica positiva deve referir-se a uma ou mais das seguintes melhora na doença: (1) uma redução no tamanho tumoral; (2) uma redução no número de
20 células cancerosas (ou seja, neoplásicas); (3) um aumento na morte das células neoplásicas; (4) inibição da sobrevivência da célula neoplásica; (4) inibição (ou seja, desaceleração em alguma extensão, preferivelmente, interrupção) do crescimento tumoral; (5) inibição (ou seja, desaceleração
25 em alguma extensão, preferivelmente, interrupção) da infiltração da célula cancerosa nos órgãos periféricos; (6) inibição (ou seja, desaceleração em alguma extensão, preferivelmente, interrupção) das metástases tumorais; (7) prevenção da proliferação tumoral; (8) um aumento da taxa
30 de sobrevivência do paciente; e (9) algum grau de alívio de um

ou mais sintomas associados ao câncer.

Respostas terapêuticas positivas em qualquer malignidade pode ser determinada por critérios padronizados de resposta específicos para aquela malignidade. A
5 respostas do tumor pode ser avaliada por alterações na morfologia tumoral (ou seja, carga tumoral global, tamanho tumoral, e outros) com o uso de técnicas de rastreamento, tais como ressonância nuclear magnética (RNM), exames da raios x, tomografia computadorizada (TC), imagens de
10 rastreamento ósseo, endoscopia, e coletas de amostras do tumor, incluindo aspiração da medula óssea (APM) e contagem de células tumorais na circulação. Além dessas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo submetido à terapia com o agente terapêutico anti-CD40 pode apresentar o efeito
15 benéfico de uma melhora nos sintomas associados à doença. Desse modo, para tumores de células B, o indivíduo pode apresentar uma diminuição nos denominados sintomas B, ou seja, suores noturnos, febre, perda de peso, e/ou urticária. Para condições pré-malignas, a terapia com um
20 agente terapêutico anti-CD40 pode bloquear e/ou prolongar o tempo antes do desenvolvimento de uma condição maligna relacionada, por exemplo, desenvolvimento de mieloma múltiplo em indivíduos que sofrem de gamopatia monoclonal de significância indeterminada (MGUS).

25 Uma melhora na doença pode ser caracterizada como uma resposta completa. Por "resposta completa" entende-se uma ausência de doença clinicamente detectável com normalização de qualquer exame radiológico previamente anormal, da medula óssea e líquido cefalorraquidiano (LCR) ou proteína
30 monoclonal anormal no caso de mieloma. Uma resposta como

essa deve persistir por pelo menos 4 a 8 semanas, ou em doença específica, algumas vezes 6 a 8 semanas, após o tratamento de acordo com os métodos da invenção. Alternativamente, uma melhora na doença pode ser categorizada como sendo uma resposta parcial. Por "resposta parcial" entende-se uma diminuição de pelo menos cerca de 50% em toda a carga tumoral mensurável (ou seja, o número de células malignas presentes no indivíduo, ou no volume medido de massas tumorais ou a quantidade de proteína monoclonal anormal) na ausência de novas lesões e que persiste por 4 a 8 semanas como necessário. Em mieloma, uma resposta normal (25-50% de diminuição na proteína de mieloma na urina) é também considerada uma resposta. Uma resposta como essa é aplicável somente a tumores mensuráveis.

Por "dose terapeuticamente ou profilaticamente eficaz" ou "quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz", entende-se uma quantidade de anticorpo anti-CD40 que, quando administrada, ocasiona uma resposta terapêutica positiva com relação ao tratamento de um paciente com um câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD40. Dosagens adequadas são descritas em maiores detalhes em outra parte nesta especificação. O método de tratamento pode compreender uma única administração de uma dose terapeuticamente eficaz ou múltiplas administrações de uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40, como descrito em maiores detalhes em outra parte nesta especificação.

"Tumor", como aqui usado, refere-se a todo crescimento e proliferação celulares neoplásicos, tanto malignos quanto

benignos, e a todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos. "Neoplásicos", como aqui usado, refere-se a qualquer forma de crescimento celular desregulado ou não regulado, tanto maligno quanto benigno, que resulta em
5 crescimento anormal do tecido. Portanto, "células neoplásicas" incluem células malignas e benignas que têm crescimento celular desregulado ou não regulado.

Os termos "câncer" e "canceroso" se referem ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que se
10 caracteriza tipicamente por crescimento celular desregulado. Exemplos de câncer incluem, sem limitação, linfoma e leucemia, e tumores sólidos. Por "câncer relacionado com célula B" ou "câncer de linhagem de célula B" entende-se qualquer tipo de câncer em que o crescimento
15 celular desregulado ou não regulado é associado com células B.

"Tratamento" é aqui definido como a aplicação ou administração de um anticorpo anti-CD40 a um paciente, ou a aplicação ou administração de um anticorpo anti-CD40a um
20 tecido ou linha de células isolada de um paciente, em que o paciente tem uma doença, um sintoma de uma doença ou uma predisposição para ter uma doença, em que a finalidade seja curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, ou afetar a doença, os sintomas da doença ou a predisposição
25 para a doença. Por "tratamento" também significa a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende os anticorpos anti-CD40a um paciente, ou a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende os anticorpos anti-CD40 a um tecido ou linha
30 de células isolada de um paciente, que tenha uma doença, um

sintoma de uma doença ou uma predisposição para ter uma doença, em que a finalidade seja curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar ou afetar a doença, os sintomas da doença ou a predisposição para ter a doença.

5 Por "atividade antitumoral" entende-se uma redução na taxa de proliferação ou acúmulo de células neoplásicas malignas que expressam CD40 e, desse modo, um declínio na taxa de crescimento de um tumor existente ou em um tumor que surge durante a terapia, e/ou a destruição de células
10 neoplásicas (tumoraes) existentes ou células neoplásicas formadas recentemente e, assim, uma diminuição no tamanho global de um tumor durante a terapia. A terapia com pelo menos um anticorpo anti-CD40 gera uma resposta fisiológica que é benéfica com relação ao tratamento de estados de
15 doença associados com estímulo de sinalização de CD40 em células que expressam CD40 em um humano.

Os métodos da invenção são particularmente úteis para o tratamento de cânceres e condições pré-malignas, que incluem aquelas acima listadas, que são refratárias ao
20 tratamento oncoterapêutico de primeira linha. O termo "oncoterapêutico" significa qualquer tratamento para câncer como quimioterapia, cirurgia, terapia por radiação, terapia com anticorpo anticâncer, e combinações desses. Exemplos de tratamentos oncoterapêuticos são descritos em maiores
25 detalhes em outra parte nessa. Por "refratário", entende-se que o câncer em particular é resistente, ou não responsivo a uma terapia com um agente oncoterapêutico particular. Um câncer pode ser refratário a uma terapia com um agente terapêutico particular a partir do início do
30 tratamento com a terapia particular (ou seja, não

responsiva à exposição inicial ao agente terapêutico), ou como um resultado do desenvolvimento de resistência ao agente terapêutico, durante um primeiro período de tratamento com o agente terapêutico ou durante um período de tratamento subsequente com o agente terapêutico. Portanto, a presente invenção é útil para o tratamento de um paciente humano que é refratário a uma terapia com um agente anticâncer, quando aquele paciente humano é resistente ou não responsivo à terapia com o agente anticâncer.

Os métodos da presente invenção envolvem o uso de anticorpos anti-CD40. "Anticorpos" são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 dáltons, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, embora o número de ligações dissulfeto varie entre as cadeias pesadas de isótipos diferentes de imunoglobulinas. Cada cadeia pesada e leve também tem pontes dissulfeto dentro da cadeias espaçadas regularmente. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um domínio variável (VH), seguido por diversos domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (VI) e um domínio constante na outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os domínios variáveis da cadeia leve e pesada. O termo "variável" se refere ao fato de que certas

porções dos domínios variáveis diferem intensamente em termos de seqüências entre anticorpos. As regiões variáveis conferem especificidade de ligação de antígeno. Os domínios constantes não estão diretamente envolvidos na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, como ligação de receptor Fc (FcR), participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpo, início de citotoxicidade dependente de complemento, e desgranulação de mastócitos.

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

15 Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante de suas "cadeias pesadas", as imunoglobulinas compreendem classes diferentes. Há cinco classes principais de imunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser ainda divididas em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e 20 IgA2. Os domínios constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados alfa, delta, épsilon, gama e mu, respectivamente. As estruturas da subunidade e as 25 configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Isótipos diferentes têm diferentes funções efectoras. Por exemplo, os isótipos de IgG1 e IgG3 humanos têm atividade de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC). Anticorpos 30 IgG1, em particular anticorpos IgG1 humanos, são

particularmente úteis nos métodos da presente invenção.

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

Os termos "receptor Fc" ou "FcR" são usados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas combinadas desses receptores. Receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor de ativação") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm seqüências de aminoácidos similares que diferem essencialmente nos domínios citoplasmáticos destas. O receptor de ativação FcγRIIA contém um motivo de ativação de imunorreceptor baseado em tirosina (ITAM) em seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição FcγRIIB contém um

motivo de inibição de imunorreceptor baseado em tirosina (ITIM) em seu domínio citoplasmático (veja Dacron (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234). FcRs são revisados em Ravetch e Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991);
 5 Capel e cols. (1994) *Immunomethods* 4:25-34; e de Haas e cols. (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341. Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são aqui englobados pelo termo "FcR". O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela
 10 transferência de IgGs maternas ao feto (Guyer e cols. (1976) *J. Immunol.* 117:587, e Kim e cols. (1994) *J. Immunol.* 24:249).

O termo "anticorpo" é usado em seu sentido mais amplo e cobre anticorpos totalmente montados, fragmentos de
 15 anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 (por exemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, e outros fragmentos), anticorpos de cadeia única, diacorpos, quimeras de anticorpo, anticorpos híbridos, anticorpos biespecíficos, anticorpos humanizados,
 20 e outros, e peptídeos recombinantes que compreendem os citados anteriormente. O termo "anticorpo" abrange tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais.

Como aqui usado, "anticorpos anti-CD40" englobam qualquer anticorpo que reconheça especificamente o antígeno
 25 CD40. Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos monoclonais anti-CD40, exibem uma forte afinidade de ligação para o antígeno CD40. Tais anticorpos monoclonais exibem uma afinidade por CD40 (K_D) de pelo menos 10^{-5} M,
 30 pelo menos 3×10^{-5} M, preferivelmente pelo menos 10^{-6} M, ou

pelo menos 10^{-7} M, mais preferivelmente pelo menos 10^{-8} M ou pelo menos 10^{-12} M, quando medida usando um ensaio-padrão como, por exemplo, Biacore™. A análise Biacore é conhecida na técnica e são fornecidos detalhes no *BIAapplications Handbook*. Métodos descritos em WO 01/27160 podem ser usados para modular a afinidade de ligação.

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

Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por FcγRIIIa-158V humano. Preferivelmente, um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a FcγRIIIa-158V humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 0,5 μM quando medida com o uso de um ensaio-padrão como, por exemplo, Biacore™. Como revelado no Exemplo 6 nesta especificação, o anticorpo CHIR-12.12 se liga a FcγRIIIa-158V humano com uma afinidade (K_D) de 492 nM.

Em algumas modalidades, anticorpos anti-CD40 para uso nos métodos da presente invenção, em particular anticorpos monoclonais, exibem uma forte afinidade de ligação por FcγRIIIa-158F humano. Preferivelmente, um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a FcγRIIIa-158F humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 12 μM quando medida com o uso de um ensaio-padrão como Biacore™. Preferivelmente, o anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção se liga a FcγRIIIa-158F humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 10 μM, pelo menos

cerca de 8 μM , pelo menos cerca de 6 μM , pelo menos cerca de 5 μM , pelo menos cerca de 4 μM , ou pelo menos cerca de μM . Como revelado no Exemplo 6 nessa, o anticorpo CHIR-12.12 se liga a Fc γ RIIIa-158F humano com uma afinidade (K_D) de 2,8 μM .

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

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

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

Os soros desses animais imunizados pode ser rastreado quanto à reatividade de anticorpo contra o antígeno

inicial. Podem ser isolados linfócitos dos linfonodos ou de células esplênicas e podem ainda ser rastreados quanto às células B pela seleção de células CD138-negativas e CD19-positivas. Em um aspecto, tais culturas de células B (BCCs) podem ser fundidas às células de mieloma para gerarem hibridomas, como detalhado nessa.

Soros policlonais também podem ser preparados em um animal transgênico, preferivelmente um camundongo possuindo *loci* de imunoglobulina humana. Em uma modalidade preferida, células Sf9 que expressam a proteína de interesse, (nesse caso, o antígeno CD40), são usadas como o imunógeno. A imunização também pode ser realizada pela mistura ou emulsificação da solução contendo antígeno em soro fisiológico, preferivelmente em um adjuvante como, por exemplo, adjuvante completo de Freund, e injetando-se a mistura ou emulsão por via parenteral (geralmente por via subcutânea ou intramuscular). Uma dose de 50-200 µg/injeção é tipicamente suficiente. A imunização é geralmente reforçada 2-6 semanas mais tarde com uma ou mais injeções da proteína em soro fisiológico, preferivelmente usando o adjuvante incompleto de Freund. É possível, alternativamente, gerar anticorpos por imunização *in vitro* usando métodos conhecidos na técnica, o que, para as finalidades desta invenção, é considerado equivalente à imunização *in vivo*. Anti-soros policlonais são obtidos por sangramento do animal imunizado em um recipiente de vidro ou de plástico, incubação do sangue a 25°C por um hora, seguindo por incubação a 4°C por 2-18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (por exemplo, 1.000 x g por 10 minutos). Cerca de 20-50 ml por sangramento podem ser

obtidos de coelhos.

A produção das células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) é revelada na Patente U.S. Nº 6.004.552, aqui incorporada por referência. No caso de CD40, resumidamente, seqüências que
5 codificam CD40 humano são recombinadas em um baculovírus usando vetores de transferência. Os plasmídeos são co-transfectados com DNA de baculovírus do tipo selvagem em células Sf9. Células Sf9 recombinantes infectadas com baculovírus são identificadas e purificadas por clonagem.

10 O anticorpo anti-CD40 usado nos métodos da presente invenção pode ser um anticorpo monoclonal. O termo "anticorpo monoclonal" (e "mAb") como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os
15 anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto quanto às possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. O termo não se limita em relação à espécie do anticorpo e não requer a produção do anticorpo por qualquer
20 método particular.

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

Por "epitopo" entende-se a parte de uma molécula antigênica para a qual um anticorpo é produzido e à qual o anticorpo irá se ligar. Epitopos podem compreender resíduos de aminoácidos lineares (ou seja, os resíduos dentro do
30 epitopo são dispostos seqüencialmente um após o outro de

forma linear), resíduos de aminoácidos não lineares (aqui denominados "epitopos não lineares"; esses epitopos não são dispostos seqüencialmente), ou resíduos de aminoácidos tanto lineares quanto não lineares. Um anticorpo monoclonal anti-CD40 adequado para uso nos métodos da presente invenção será capaz de se ligar especificamente a um epitopo e, antígeno CD40 humano expresso na superfície de uma célula humana, ou seja, um epitopo que é exposto ao exterior da célula.

Os anticorpos monoclonais as serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiramente descrito por Kohler e cols. (1975) *Nature* 256:495, ou podem ser feitos pelo métodos de DNA recombinante (veja, por exemplo, Patente U.S. No. 4.816.567). Anticorpos monoclonais também podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo geradas com a utilização das técnicas descritas, por exemplo, em McCafferty e cols. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) e na Patente U.S. N° 5.514.548. Clackson e cols. (1991) *Nature* 352:624-628 e Marks e cols. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 descrevem o isolamento de anticorpos murídeos e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fago. Publicações subseqüentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (na faixa de nM) por embaralhamento de cadeia (Marks e cols. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como estratégia para a construção de bibliotecas de fago bem grandes (Waterhouse e cols. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2.265-2.266). Desse modo, essas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais

de hibridoma de anticorpo monoclonal para o isolamento de anticorpos monoclonais.

No método tradicional de Kohler e cols. (1975) Nature 256:495-496, tipicamente, um camundongo é imunizado com uma
5 solução contendo um antígeno. A imunização pode ser realizada pela mistura ou emulsificação da solução contendo antígeno em soro fisiológico, preferivelmente em um adjuvante como, por exemplo, adjuvante completo de Freund, e injeção da mistura ou da emulsão por via parenteral.

10 Qualquer método de imunização conhecido na técnica pode ser usado para se obter os anticorpos monoclonais da invenção. Após imunização do animal, o baço (e, opcionalmente, vários linfonodos grandes) são removidos e dissociados em células únicas. As células esplênicas podem ser rastreadas pela
15 aplicação de uma suspensão de células em uma placa ou poço revestido com o antígeno de interesse. As células B que expressam imunoglobulina ligada à membrana específica para o antígeno se ligam à placa e não saem com o enxágüe. As células B resultantes, ou todas as células esplênicas
20 dissociadas, são então induzidas a se fundirem com células de mieloma para formarem hibridomas, e são cultivadas em um meio seletivo. As células resultantes são plaqueadas por diluição serial e são testadas quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno de
25 interesse (e que não se ligam aos antígenos não relacionados). Os hibridomas secretores de anticorpo monoclonal (mAb) selecionados são então cultivados *in vitro* (por exemplo, em frascos de cultura de tecido ou em reatores de fibra oca) ou *in vivo* (como ascites em
30 camundongos).

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

Quando os anticorpos antagonistas anti-CD40 da
10 invenção tiverem que ser preparados usando métodos de DNA recombinante, o DNA que codifica os anticorpos monoclonais será prontamente isolado e seqüenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, com a utilização de sondas de oligonucleotídeo que são capazes de se ligar
15 especificamente aos genes que codificam as cadeias pesadas e leves de anticorpos murídeos). As células de hibridoma aqui descritas servem como uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células
20 hospedeiras como, por exemplo, células de *E. coli*, células COS de símios, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que de outra forma não produzem a proteína de imunoglobulina, para se obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras
25 recombinantes. Artigos de revisão sobre expressão recombinante em bactérias de DNA que codifica o anticorpo incluem Skerra e cols. (1993) *Curr. Opinion in Immunol.* 5:256 e Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. Alternativamente, o anticorpo pode ser produzido em uma
30 linha de células como uma linha de células CHO, como

revelado nas Patentes U.S. Nºs 5.545.403; 5.545.405; e 5.998.144, aqui incorporadas por referência. Resumidamente, a linha de células é transfectada com vetores capazes de expressar uma cadeia leve e uma cadeia pesada, respectivamente. Pela transfecção de duas proteínas em vetores separados, podem ser produzidos anticorpos quiméricos. Outra vantagem é a glicosilação correta do anticorpo.

Uma "célula hospedeira", como aqui usada, se refere a um microorganismo ou uma célula ou linha de células eucarióticas cultivadas como uma entidade unicelular que pode ser, ou que foi, usada como receptora para um vetor recombinante, ou outros polinucleotídeos de transferência, e inclui a prole da célula original que foi transfectada. Entende-se que a prole de uma única célula pode não ser necessariamente completamente idêntica em morfologia ou em complemento de DNA genômico ou total à parente original, em função de uma mutação natural, accidental ou deliberada.

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

Anticorpos monoclonais para CD40 são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, as seções dedicadas ao antígeno da célula B em McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, Nova York); Patentes

U.S. N^{os} 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959;
 Publicação Internacional N^{os} WO 00/63395, WO 02/28905 e WO
 02/28904; Gordon e cols. (1988) *J. Immunol.* 140:1.425;
 Valle e cols. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1.463; Clark e
 5 cols. (1986) *PNAS* 83:4.494; Paulie e cols. (1989) *J.*
Immunol. 142:590; Gordon e cols. (1987) *Eur. J. Immunol.*
 17:1.535; Jabara e cols. (1990) *J. Exp. Med.* 172:1.861;
 Zhang e cols. (1991) *J. Immunol.* 146:1.836; Gascan e cols.
 (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau e cols. (1991) *Clin.*
 10 *Immunol. Spectrum* 3:8; e Banchereau e cols. (1991) *Science*
 251:70; todos os quais são aqui incorporados por
 referência.

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

incorporada por referência) e primatas não humanos (por exemplo, macaco do Velho Mundo, pongídeos etc.; veja, por exemplo, as Patentes U.S. Nºs 5.750.105 e 5.756.096; aqui incorporadas por referência).

5 Como acima observado, o termo "anticorpo" como aqui usado engloba anticorpos humanizados. Por "Humanizados" significa formas de anticorpos que contêm seqüência mínima derivada de seqüências de imunoglobulina não humana. Na maioria dos casos, anticorpos humanizados são

10 imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) nas quais resíduos de uma região hipervariável (também conhecida como região determinante de complementaridade ou CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo doador)

15 como, por exemplo, camundongo, rato, coelho, ou primata não humano, tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. A frase "região determinante de complementaridade" se refere às seqüências de aminoácidos que em conjunto definem a afinidade e especificidade de

20 ligação da região Fv natural de um sítio de ligação nativo de imunoglobulina. Veja, por exemplo, Chothia e cols. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat e cols. (1991) "U.S. Dept. of Health and Human Services", Publicação do NIH Nº 91-3242). A frase "região constante" se refere à

25 porção da molécula do anticorpo que confere funções efectoras. Em trabalho anterior sobre a produção de anticorpos não imunogênicos para uso em terapia de doença humana, regiões constantes de camundongo foram substituídas por regiões constantes humanas. As regiões constantes dos

30 anticorpos humanizados do indivíduo foram derivadas de

imunoglobulinas humanas. No entanto, esses anticorpos humanizados podem despertar uma resposta imune indesejada e potencialmente perigosa em humanos, e houve perda de afinidade.

5 A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones e cols. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann e cols. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen e cols. (1988) *Science* 239:1.534-1.536), pela utilização de CDRs ou seqüências de CDR de
10 roedor ou de roedor mutante como substituição para as seqüências correspondentes de um anticorpo humano. Veja também as Patentes U.S. N^{os} 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205; aqui incorporadas por referência. Em alguns casos, os resíduos dentro das regiões
15 estruturais de uma ou mais regiões variáveis da imunoglobulina humana são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes (veja, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; e 6.180.370). Além disso, anticorpos humanizados podem compreender
20 resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Essas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo (por exemplo, para obter a afinidade desejada). Em geral, o anticorpo humanizado irá compreender substancialmente todos de pelo
25 menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas, ou substancialmente todas, as regiões hipervariáveis correspondem àquelas de uma imunoglobulina não humana, e todas, ou substancialmente todas, as regiões estruturais são aquelas de uma seqüência de imunoglobulina humana. O
30 anticorpo humanizado opcionalmente também irá compreender

pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, veja Jones e cols. (1986) *Nature* 331:522-525; Riechmann e cols. (1988) *Nature* 332:323-329; e Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596; aqui incorporados por referência. Conseqüentemente, tais anticorpos "humanizados" podem incluir anticorpos nos quais substancialmente menos de um domínio variável intacto humano foi substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e, possivelmente, alguns resíduos estruturais, são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Veja também a Patente U.S. N^o 6.180.370, e a Publicação Internacional N^o WO 01/27160, em que são discutidos anticorpos humanizados e técnicas para a produção de anticorpos humanizados que melhoram a afinidade para um antígeno predeterminado.

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

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

referência.

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

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

Como acima observado, o termo "anticorpo" como aqui

usado também engloba fragmentos de anticorpo que podem se ligar a antígeno. "Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região de ligação de antígeno ou a região variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata e cols. (1995) *Protein Eng.* 10:1,057); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticorpo. A digestão com papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação de antígeno e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua habilidade para cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina gera um fragmento F(ab')₂ que tem dois sítios de combinação de antígeno e ainda é capaz de entrecruzar o antígeno.

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

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

Fragmentos de um anticorpo anti-CD40 são adequados para uso nos métodos da invenção desde que eles retenham a afinidade desejada do anticorpo de comprimento total. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 irá reter a capacidade de se ligar ao antígeno de CD40. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades similares ao anticorpo de comprimento total correspondente. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 antagonista de comprimento total será preferivelmente capaz de se ligar especificamente a um antígeno de CD40 humano expresso na superfície de uma célula humana, e é livre de atividade agonista significativa mas exibe atividade antagonista quando ligado a um antígeno de CD40 em uma célula que expressa CD40 humano. Tais fragmentos são aqui denominados fragmentos "de ligação de antígeno". Fragmentos de um anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção irão reter preferivelmente a capacidade de de ligar a FcR ou FcRs relevantes. Portanto, por exemplo, um

fragmento de um anticorpo anti-CD40 pode reter a capacidade de se ligar a FcγRIIIa. Portanto, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 de comprimento total pode ser capaz de se ligar especificamente a um antígeno de CD40 de superfície celular, e também capaz de se ligar a FcγRIIIa em células efectoras humanas, como células natural killer (NK). Tais fragmentos são aqui referidos como fragmentos de "ligação a FcR". Tais fragmentos geralmente incluirão pelo menos parte do domínio constante da cadeia pesada.

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

Fragmentos de ligação de antígeno adequados de um anticorpo compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a região de ligação de

antígeno ou variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, sem limitação, fragmentos Fab, $F(ab')_2$ e F_v e moléculas de anticorpo de cadeia única. Por "Fab" entende-se um fragmento monovalente de ligação de antígeno de uma imunoglobulina que é composto da cadeia leve e parte da cadeia pesada. Por $F(ab')_2$ entende-se um fragmento bivalente de ligação de antígeno de uma imunoglobulina que contém tanto cadeias leves quanto parte de ambas as cadeias pesadas. Por "Fv de cadeia única" ou "sFv" entende-se fragmentos que compreendem os domínios V_H e V_L de um anticorpo, nos quais esses domínios estão presentes em uma única cadeia polipeptídica. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 e 5.856.456, aqui incorporadas por referência. Geralmente, o polipeptídeo Fv ainda compreende um vinculador polipeptídico entre os domínios V_H e V_L que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão sobre sFv, veja Pluckthun (1994) em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg e Moore (Springer-Verlag, Nova York), pp. 269-315. Fragmentos de ligação de antígeno dos anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui revelados também podem ser conjugados a uma citotoxina para causar a morte de células-alvo como aqui descrito abaixo.

Em algumas modalidades da invenção, o anticorpo anti-CD40 é um anticorpo anti-CD40 antagonista. Quando tais anticorpos se ligam a CD40 apresentado na superfície de células humanas, como células B humanas, eles não causam atividade agonista significativa. Em algumas modalidades, sua ligação a CD40 apresentada na superfície de células

humanas resulta na inibição da proliferação e diferenciação dessas células humanas. Os anticorpos anti-CD40 adequados para uso nos métodos da invenção incluem aqueles anticorpos que podem exibir atividade antagonista contra células humanas normais e malignas que expressam o antígeno CD40 de superfície celular.

Por "atividade agonista" entende-se que a substância funciona como um agonista. Um agonista combina com um receptor em uma célula e inicia uma reação ou atividade que é similar ou igual àquela iniciada pelo ligante natural do receptor. Um agonista de CD40 induz qualquer uma ou todas, sem limitação, as seguintes respostas: proliferação e/ou diferenciação de células B; supra-regulação de adesão intercelular por meio de tais moléculas como ICAM-1, E-seletina, VCAM, e outras; secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF e outras; transdução de sinal através do receptor de CD40 por tais vias como TRAF (por exemplo, TRAF2 e/ou TRAF3), MAP quinases como NIK (quinase indutora de NF-KB), I-kapa B quinases (IKK cc/(3), fator de transcrição NF-KB, Ras e a via MEK/ERK, a via PI3K/AKT, a via P38 MAPK, e outras; transdução de um sinal anti-apoptótico por tais moléculas como XIAP, mcl-1, bcl-x, e outras; geração de memória de célula B e/ou T; produção de anticorpo de célula B; troca de isotipo de célula B, supra-regulação de expressão de superfície celular de MHC Classe II eCD80/86, e outros.

Por atividade agonista "significativa" significa uma atividade agonista de pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um

controle negativo, como medido em um ensaio de uma resposta de célula B. Preferivelmente, atividade agonista "significativa" é uma atividade agonista que é pelo menos 2 vezes maior ou pelo menos 3 vezes maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, como medido em um ensaio de uma resposta de célula B. Desse modo, por exemplo, quando a resposta de célula B de interesse for proliferação de células B, atividade agonista "significativa" seria a indução de um nível de proliferação de células B que é pelo menos 2 vezes maior ou pelo menos 3 vezes maior do que o nível de proliferação de células B induzido por uma substância neutra ou por um controle negativo. Em uma modalidade, uma imunoglobulina inespecífica, por exemplo, IgG1, que não se liga a CD40, serve como controle negativo. Uma substância "livre de atividade agonista significativa" exibiria uma atividade agonista de não mais que cerca de 25% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, preferivelmente no máximo cerca de 20% maior, 15% maior, 10% maior, 5% maior, 1% maior, 0,5% maior ou até mesmo no máximo cerca de 0,1% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controle negativo, como medido em um ensaio de resposta de célula B.

Por "atividade antagonista" entende-se que a substância funciona como um antagonista. Um anticorpo antagonista anti-CD40 da invenção evita ou reduz a indução de qualquer uma das respostas induzidas por ligação do receptor de CD40 a um ligante do agonista, particularmente CD40L. Os antagonistas podem reduzir a indução de qualquer

uma ou mais das respostas à ligação agonista em 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferivelmente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mais preferivelmente 70%, 80%, 85% e, principalmente, 90%, 95%, 99% ou 100%. Métodos para a
5 medida da especificidade de ligação de ligante de CD40 e atividade antagonista do agente terapêutico anti-CD40, por exemplo, um anticorpo anti-CD40, são conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, ensaios-padrão de ligação competitiva, ensaios para monitoramento da secreção de
10 imunoglobulina por células B, ensaios de proliferação de células B, ensaios de proliferação de células Banchereau-Like-B, ensaios de célula T *helper* para a produção de anticorpo, co-estimulação de ensaios de proliferação de células B e ensaios para supra-regulação de marcadores da
15 ativação de célula B. Veja, por exemplo, tais ensaios revelados em WO 00/75348 e Patente U.S. No. 6.087.329, aqui incorporados por referência. Veja também, WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294W0, cujos
20 conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

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

Em uma modalidade da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40 é livre de atividade agonista significativa em uma resposta celular. Em outra modalidade da invenção, o
30 anticorpo antagonista anti-CD40 é livre de atividade

agonista significativa em ensaios de mais de uma resposta celular (por exemplo, proliferação e diferenciação, ou proliferação, diferenciação e, para células B, produção de anticorpo).

5 De interesse particular são anticorpos anti-CD40 antagonistas que são livres de atividade agonista significativa como aqui definido mas exibem atividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 em células B humanas. Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-
10 CD40 antagonista é livre de atividade agonista significativa em uma resposta de célula B. Em uma outra modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista é livre de atividade agonista significativa em ensaios de mais de uma resposta de célula B (por exemplo, proliferação
15 e diferenciação, ou proliferação, diferenciação, e produção de anticorpo).

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

humano na superfície de uma célula B humana.

O anticorpo anti-CD40 pode ser um antagonista da proliferação de célula B induzida por CD40L solúvel ou de superfície celular, como medido em um ensaio de proliferação de célula B. Ensaaios de proliferação de célula B adequados são conhecidos na técnica. Ensaaios de proliferação de célula B adequados são também descritos abaixo. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 antagonista estimula a proliferação de célula B em um nível que é de não mais que cerca de 25% maior que a proliferação de célula B induzida por uma substância neutra ou controle negativo, preferivelmente não mais que cerca de 20% maior, 15% maior, 10% maior, 5% maior, 1% maior, 0,5% maior, ou ainda não mais que cerca de 0,1% maior que a proliferação de célula B induzida por uma substância neutra ou controle negativo.

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

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

Ainda em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 é
15 um antagonista da produção de anticorpos induzida por célula T humana por células B humanas como medido no ensaio de célula T helper humana para produção de anticorpo por células B. Desse modo, o nível de produção do anticorpo IgG, produção do anticorpo IgM, ou produção do anticorpo
20 IgG e IgM por células B estimulada por células T na presença do anticorpo anti-CD40 antagonista é de não mais que cerca de 50% da produção do anticorpo respectivo por células B estimuladas por células T na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (ou seja, pelo menos 75% de
25 inibição), preferivelmente não mais que cerca de 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5%, ou ainda não mais que cerca de 0,1% da produção do anticorpo respectivo por células B estimuladas por células T na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista. Anticorpos anti-CD40 antagonistas
30 adicionais incluem os anticorpos monoclonais referidos como

SD12, 3A8 e 3C6, que são secretado por um hibridoma que tem os números de acesso ATCC HB 11339, HB 12024 e HB 11340, respectivamente. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.315.998, aqui incorporada em sua totalidade por
5 referência.

Por exemplo, os ensaios a seguir podem ser usados para avaliar a atividade antagonista de um anticorpo anti-CD40. Células B humanas para esses ensaios podem ser obtidas, por exemplo, por isolamento a partir tonsilas obtidas de
10 indivíduos que se submetem a tonsilectomias, essencialmente como descrito em De Groot e cols. (1990) Lymphokine Research (1990) 9:321. Resumidamente, o tecido é disperso com laminas de escalpo, células fagocíticas e NK são esvaziadas por tratamento com 5 mM L-leucina metil éster e
15 células T são removidas por um ciclo de roseteamento (ligação de dois ou mais eritrócitos não infectadas) com eritrócitos de carneiro (SRBC) tratados com brometo de 2-aminoetil isotiourônio. A pureza das preparações de linfócitos B resultantes pode ser avaliada por rotulagem
20 imunofluorescente indireta com anti(CD20) mAb B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) ou anti-(CD3) mAb OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) e um fragmento de F(ab')₂ conjugado a FITC de coelho anti-(camundongo Ig) (Zymed, San Francisco, CA), e análise FACS.

25 **Ensaio de proliferação de célula B**

Células B (4×10^4 por cavidade) são cultivadas em 200 μ L IMDM suplementado com 10% soro fetal de bezerro em placas de microtítulo de 96 cavidades de fundo plano. As células B são estimuladas pela adição de anticorpos anti-
30 (IgM) imobilizados (Immunobeads; 5 μ g/ml; BioRad, Richmond,

California). Quando desejado, 100 U/ml de IL-2 recombinante é adicionada. Concentrações variáveis de anticorpos monoclonais de teste (mAbs) são adicionadas no surgimento das microculturas e a proliferação é avaliada no dia 3 por
5 medição da incorporação de (³H)-timidina depois de 18 horas de pulsos. Um anticorpo anti-CD40 antagonista não co-estimula significativamente a proliferação de células B humanas na presença de anti-IgM imobilizado ou na presença de anti-IgM imobilizado e IL-2.

10 **Ensaio de proliferação de célula B semelhante a Banchereau**

Para testar a capacidade de anticorpos monoclonais anti-CD40 para estimular a proliferação de células B em um sistema de cultura análogo aquela descrito por Banchereau e cols. (1991) Science (1991) 251:70, células transfectantes
15 de camundongo 3T6 que expressam a forma alélica HR de FcγRII humano são usadas. Células B (2×10^4 por cavidade) são cultivadas em microcavidades de fundo plano na presença de 1×10^4 de células transfectantes (irradiadas com 5.000 Rad) em 200 µl IMDM suplementado com 10% soro fetal de
20 bezerro e 100 U/ml de IL- 4 recombinante. Antes da adição das células B, as células 3T6 aderem ao plástico de cultura por pelo menos 5 horas. mAbs anti-CD40 são adicionados em concentrações que variam de 15 ng/ml a 2.000 ng/ml e a proliferação de células B é avaliada por medição da
25 incorporação de timidina no dia 7, em 18 horas de pulsos com [³H] timidina.

Inibição da proliferação de células B estimulada por S2C6 com o uso de mAbs anti-CD40 antagonistas

Anticorpos monoclonais antagonistas anti-CD40 (mAbs)
30 também podem ser caracterizados por sua capacidade de

inibir a estimulação da proliferação de células B por um anticorpo anti-CD40 como S2C6 (also conhecido como SGN-14, que é um agonista da estimulação por CD40 da proliferação de células B normais; Francisco e cols. (2000) Cancer Res. 60:3225-3231) com o uso do ensaio de proliferação de célula B acima descrito. Células B tonsilares humanas (4×10^4 por cavidade) são cultivadas em 200 μ l em microcavidades na presença de anti-IgM ligada a glóbulos de Sefarose (5 μ g/ml) e mAb anti-CD40 S2C6 (1,25 μ g/ml). Concentrações variáveis de um mAb anti-CD40 de interesse são adicionadas e a incorporação de [^{3} H]-timidina é avaliada depois de 3 dias. Como um controle anti-(glicocerebrosidase) mAb 8E4 pode ser adicionado em concentrações similares. Barneveld e cols. (1983) Eur. J. Biochem. 134:585. Um anticorpo anti-CD40 antagonista pode inibir a co-estimulação da proliferação de células B humanas induzida por anti-IgM por mAb S2C6, por exemplo, em pelo menos 75% ou mais (ou seja, proliferação estimulada por S2C6 na presença de um anticorpo antagonista anti-CD40 é de não mais que 25% daquela observada na ausência do anticorpo antagonista anti-CD40). Em contraste, nenhuma inibição significativa deve ser observada com quantidades equivalentes de mAb 8E4 não relevante, direcionadas a β -glicocerebrosidase. Barneveld e cols., supra. Tal resultado indica que os mAbs anti-CD40 não liberam sinais estimuladores para a proliferação de células B humanas, mas, ao contrário, podem inibir sinais estimuladores exercidos ao despertar CD40 com um outro mAb.

Ensaio de ativação de células B com células EL4B5

Zubler e cols. (1985) J. Immunol. (1985) 134:3662

observou que um subclone mutante da linha do timoma de camundongo EL-4, conhecida como EL4B5, pode estimular fortemente as células B de origem murídea e humana para proliferar e diferenciar em células plasmáticas que secretam imunoglobulina *in vitro*. Essa ativação é antígeno-independente e ao restrito a MHC. Para estimulação ótima de células B humanas, a presença de sobrenadante de células T humanas ativadas era necessária mas uma resposta de células B também ocorreu quando células EL4B5 foram pré-ativadas com forbol-12-miristato 13-acetato (PMA) ou IL-1. Zubler e cols. (1987) Immunological Reviews 99:281; e Zhang e cols. (1990) J. Immunol. 144:2955. A ativação de células B nesse sistema de cultura é eficiente, experimentos de diluição limitante mostram que a maioria das células B humanas pode ser ativada para proliferar e diferenciar em células que secretam anticorpo. Wen e cols. (1987) Eur. J. Immunol. 17:887.

Células B (1.000 por cavidade) são cultivadas juntas com células irradiadas (5,000 Rad) EL4B5 (5 x 10⁴ por cavidade) em placas de microtítulo de fundo plano em 200 µl IMDM suplementado com 10% soro fetal de bezerro inativado por calor, 5 ng/ml forbol-12- miristato 13-acetato (Sigma) e 5% de sobrenadante de célula T humana. mAbs são adicionados em concentrações variáveis no surgimento das culturas e a incorporação de timidina é avaliada no dia 6 depois de 18 horas de pulsos com [³H]-timidina. Para a preparação de sobrenadante de célula T, células T purificadas são cultivadas em uma densidade de 10⁶/ml por 36 horas na presença de 1 µg/ml PHA e 10 ng/ml PMA. Wen e cols. (1987) Eur. J. Immunol. (1987) 17:887. Sobrenadante

de célula T é obtido por centrifugação das células e estocado a -20°C. A eficácia dos sobrenadantes de célula T no aumento da proliferação de células B humanas em culturas de células B EL4B5 é testada e os sobrenadantes mais
5 eficazes são reunidos para uso em experimentos. Quando da avaliação do efeito de um anticorpo anti-CD40 sobre a proliferação de célula B humana induzida por EL4B5, um anticorpo monoclonal como MOPC-141 (IgG2b) pode ser adicionado como um controle.

10 Um anticorpo antagonista anti-CD40 pode inibir a proliferação de célula B estimulada pela linha de células EL4B5, por exemplo, em pelo menos 75% ou mais (ou seja, proliferação de célula B induzida por EL4B5 na presença de um anticorpo antagonista anti-CD40 é de não mais que 25%
15 daquela observada na ausência do anticorpo antagonista anti-CD40). Em contraste, um anticorpo de controle como MOPC-141 pode não ter efeito significativo sobre a proliferação de célula B induzida por EL4B5.

20 **Ensaio de célula T Helper humana para produção de anticorpo por células B**

Um anticorpo antagonista anti-CD40 pode funcionar como um antagonista da produção de imunoglobulina por células B. Um anticorpo anti-CD40 pode ser testado para esse tipo de atividade antagonista por avaliação da capacidade do
25 anticorpo de inibir a produção de imunoglobulina por células B que foram estimuladas em uma maneira dependente de contato com células T ativadas em um ensaio de célula T helper. Dessa forma, placas de cultura de tecido de 96 cavidades são revestidas com uma diluição de 1:500 de
30 fluido de ascite de anti-CD3 mAb CLB-T3/3 (CLB, Amsterdam,

The Netherlands). Como indicado mAbs co-estimuladores são adicionados: mAbs anti-CD2 CLB-T11.1/1 e CLB-T11.2/1 (CLB, Amsterdam, The Netherlands), ascite 1:1000 e mAb anti-CD28 CLB-28/1 (CLB, Amsterdam, The Netherlands).

5 Subseqüentemente, células T tonsilares (irradiadas, 3.000 Rad; 10^5 por cavidade), células B tonsilares (10^4 por cavidade), e rIL-2 (20 U/ml) são adicionados. O primeiro final volume de cada cultura de células é 200 μ l. Depois de 8 dias, as células são centrifugadas, e o sobrenadante
10 livre de células é coletado. As concentrações de IgM e IgG humanas em amostras (diluídas) é estimada por ELISA como descrito abaixo.

Em uma modalidade, células B tonsilares humanas (10^4 /cavidade) são cultivadas junto com células T
15 purificadas irradiadas (3.000 rad, 10^5 /cavidade) em placas de 96 cavidades, revestidas com mAb anti-CD3 e com ou sem diferentes mAbs para co-estimular as células T. depois de 8 dias de cultura os sobrenadantes são coletados para a determinação da produção de imunoglobulina pelas células B.
20 A produção de imunoglobulina pelas células B é avaliada pelo ensaio de ELISA descrito abaixo. O anticorpo anti-CD40 de interesse é adicionado em concentrações variáveis do surgimento das culturas. Como um controle, mAb MOPC-141 pode ser adicionado.

25 Um anticorpo antagonista anti-CD40 pode inibir a produção de anticorpo IgG e IgM de células B estimuladas por células T humanas em pelo menos 50% ou mais (ou seja, produção de anticorpo induzida por células T por células B na presença de um anticorpo antagonista anti-CD40 é de não
30 mais que 50% daquela observada na ausência do anticorpo

antagonista anti-CD40). Em contraste, um anticorpo de controle como MOPC-141 não deve ter qualquer efeito significativo sobre a produção de anticorpo induzida por células T por células B.

5 Ensaio de ELISA para quantificação de imunoglobulina

As concentrações de IgM e IgG humanas são estimadas por ELISA. Placas de ELISA de 96 cavidades são revestidas com 4 µg/ml de mAb de IgG anti-humana de camundongo MH 16-01 (CLB, Amsterdam, The Netherlands) ou com 1,2 µg/ml de mAb de IgM anti-humana de camundongo 4102 (Tago, Burlingame, CA) em 0,05 M tampão de carbonato (pH = 9,6), por incubação por 16 horas a 4°C. As placas são lavadas 3 vezes com PBS-0,05% Tween-20 (PBS-Tween) e saturadas com BSA por 1 hora. Depois de 2 lavagens, as placas são incubadas por 1 hora a 37°C com diferentes diluições da amostras de teste. Depois de 3 lavagens, Ig ligada é detectada por incubação por 1 hora a 37°C com 1 µg/ml mAb de IgG anti-humana de camundongo rotulado com peroxidase MH 16-01 (CLB) ou mAb de IgG anti-humana de camundongo MH 15-01 (CLB). As placas são lavadas 4 vezes e a atividade de peroxidase ligada é revelada pela adição de O-fenilenodiamina como um substrato. Soro humano padrão (H00, CLB) é usado para estabelecer uma curva padrão para cada ensaio.

25 Anticorpos anti-CD40 antagonistas são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, o anticorpo anti-CD40 humano produzido pelo hibridoma designado F4-465 revelado nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos. 20020142358 e 20030059427; aqui incorporados em sua totalidade por referência. F4-465 foi obtido de camundongo HAC (Kuroiwa e

cols. (2000) Nature Biotech. 10:1086 (2000)) e portanto, expressa a cadeia leve humana lambda. Veja também, WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 5 2005/044294WO, cujos conteúdos são aqui incorporados em sua totalidade por referência.

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

Como explicado em outra parte nessa, os inventores 20 fizeram o achado surpreendente que, ao contrário de outros anticorpos, anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, são capazes de mediar potente citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células alvo que expressam CD40 via ligação aos dois alótipos de FcγRIIIa de aminoácido 158 (V 25 ou F) em células natural killer (NK) de paciente humano. Portanto, anticorpos anti-CD40, como CHIR-12.12, podem ser usados no tratamento de cânceres e condições pré-malignas associadas com células que expressam CD40 em pacientes humanos heterozigóticos ou homozigóticos para FcγRIIIa-158F 30 (genótipo V/F ou F/F), além de pacientes humanos

homozigóticos para FcγRIIIa-158V (genótipo V/V). A presente invenção é especialmente vantajosa para o tratamento de cânceres e condições pré-malignas que não são responsivas ao tratamento com rituximab (Rituxan®), porque a atividade
5 clínica de rituximab em NHL não está correlacionada com o genótipo de FcγRIIIa do paciente.

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

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

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

- a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12;
- b) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de
30 células de hibridoma 12.12;

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

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

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

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

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

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

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

e

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

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

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

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

citometria de fluxo. Anticorpos CHIR 5.9 e CHIR-12.12 competem um com o outro por ligação a CD40 mas não com 15B8, o anticorpo anti-CD40 monoclonal descrito em Pedido Provisório U.S. No. de Série 60/237.556, intitulado "Human Anticorpos anti-CD40," depositado em 2 de outubro de 2000, e Pedido Internacional PCT No. PCT/US01/30857, também intitulado "Human Anti-CD40 Antibodies," depositado em 2 de outubro de 2001 (Caso No. PP16092.003) e publicado como WO 2002/028904, ambos aqui incorporados em sua totalidade por referência. Quando testado *in vitro* para efeitos sobre a proliferação de células B a partir de indivíduos humanos normais, CHIR-12.12 age como anticorpo anti-CD40 antagonista. Além disso, CHIR-12.12 não induz forte proliferação de linfócitos humanos a partir de indivíduos normais. O anticorpo é capaz de matar células alvo que expressam CD40 por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). A afinidade de ligação de CHIR-12.12 por CD40 humano é 5×10^{-10} M, como determinado no ensaio Biacore™.

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

de alanina na posição 153 de Id. de Seq. N°:4). As
seqüências de nucleotídeos que codificam a cadeia leve e
cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 são apresentadas em Id.
de Seq. N°:1 (seqüência codificadora para a cadeia leve
5 para mAb CHIR-12.12) e Id. de Seq. N°:3 (seqüência
codificadora para a cadeia pesada para mAb CHIR-12.12).
Hibridomas que expressam o anticorpo CHIR-12.12 foram
depositados com a ATCC com a designação de depósito de
patente de PTA-5543.

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

polinucleotídeos correspondentes, como é conhecido na técnica. Tais proteínas de fusão são descritas com referência a conjugação de anticorpos como mostrados em outra parte nessa.

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

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

(1983) "Techniques in Molecular Biology" (MacMillan Publishing Company, Nova York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel e cols. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367; Sambrook e cols. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, Nova York); Patente U.S. N° 4.873.192; e as referências nela citadas; aqui incorporados por referência. Um guia sobre como adequar substituições de aminoácidos que não afetem a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrado no modelo de Dayhoff e cols. (1978) no *Atlas of Protein Sequence e Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado por referência. Substituições conservadores como, por exemplo, a troca de um aminoácido com outro que possui propriedades similares, podem ser preferidas. Exemplos de substituições conservadoras incluem, sem limitação, Gly<=>Ala, Val<=>Ile<=>Leu, Asp<=>Glu, Lys<=>Arg, Asn<=>Gln e Phe<=>Trp<=>Tyr.

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

devem colocar a seqüência fora do quadro de leitura e, preferivelmente, não criarão regiões complementares que possam produzir estrutura de mRNA secundária. Veja a Publicação de Pedido de Patente EP N° 75.444.

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

Preferivelmente, variantes de um anticorpo de referência, por exemplo, um anticorpo antagonista anti-CD40 têm seqüências de aminoácidos que possuem pelo menos 70% ou
15 75% de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de seqüência para seqüência de aminoácidos para a molécula de anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo
20 monoclonal CHIR-12.12 aqui descrito, ou a uma porção mais curta da molécula de anticorpo de referência. Mais preferivelmente, as moléculas compartilham pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência. Para as finalidades da presente invenção, o percentual de
25 identidade de seqüência é determinado usando o algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman usando uma pesquisa de espaços afins com uma penalidade de espaço aberto de 12 e uma penalidade de extensão de espaço de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é ensinado em Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl.*
30

Math. 2:482-489. Uma variante pode, por exemplo, diferir do do anticorpo de referência, por exemplo, anticorpo antagonista anti-CD40 por apenas 1 a 15 resíduos de aminoácidos, apenas 1 a 10 resíduos de aminoácidos como, 5 por exemplo, 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2 ou até mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Com relação ao alinhamento ótimo de duas seqüências de aminoácidos, o segmento contíguo da seqüência de aminoácidos variante pode ter resíduos de aminoácidos 10 adicionais ou resíduos de aminoácidos deletados com relação à seqüência de aminoácidos de referência. O segmento contíguo usado para comparação com a seqüência de aminoácidos de referência incluirá pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, e pode ter 30, 40, 50 ou mais 15 resíduos de aminoácidos. Podem ser feitas correções para a identidade de seqüência associadas às substituições conservadoras ou espaços de resíduos (veja algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman).

A estrutura química precisa de um polipeptídeo capaz 20 de se ligar especificamente ao CD40 e que retém atividade antagonista, particularmente quando ligado ao antígeno CD40 em células alvo, depende de diversos fatores. Como grupos amino e carboxil ionizáveis estão presentes na molécula, um polipeptídeo específico pode ser obtido como um sal ácido 25 ou básico ou em forma neutral. Todas essas preparações que retêm sua atividade biológica quando colocadas em condições ambientais adequadas estão incluídas na definição de anticorpos antagonistas anti-CD40 como aqui usada. Além disso, a seqüência de aminoácidos primária do polipeptídeo 30 pode ser aumentada por derivação usando porções de açúcar

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

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

O anticorpo anti-CD40 para uso nos métodos da invenção

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

Ensaio para tais atividades biológicas podem ser realizados como aqui descrito em pedidos provisórios
30 intitulados "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and

Methods for Their Use", depositado em 4 de novembro de 2003, 26 de novembro de 2003 e 27 de abril de 2004, e Pedidos de Patente U.S. designados N^{os} 60/517.337 (Processo N^o PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (Processo N^o PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (Processo N^o PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, e Pedido de Patente Internacional N^o PCT/US2004/037152 (Processo N^o PP20107.004 (035784/282916)), publicado como WO 2005/044854, também intitulado "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*", depositado em 4 de novembro de 2004; cujos conteúdos são aqui incorporada em sua totalidade por referência. Veja também os ensaios descritos em Schultze e cols. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton e cols. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans e cols. (2000) J Immunol. 164:688697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman e cols. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan e cols. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom e cols. (1993) Immunology 79:439-444; e Patentes U.S. N^{os} 5.674.492 e 5.847.082, aqui incorporadas por referência.

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

representativo, polipeptídeo CD40 rotulado é precipitado por anticorpos candidatos em uma amostra, por exemplo, em combinação com anticorpos monoclonais despertados contra um ou mais epítopos dos anticorpos monoclonais da invenção.

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

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

anticorpo anti-CD40 e um epitopo de interesse pode ser facilitada pela anexação de uma substância detectável ao anticorpo. Meios de detecção adequados incluem a utilização de rótulos, tais como radionuclídeos, enzimas, coenzimas, substâncias fluorescentes, substâncias quimioluminescentes, cromógenos, substratos ou co-fatores de enzimas, inibidores de enzimas, complexos de grupo prostético, radicais livres, partículas, corantes, e semelhantes. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupo prostético adequados incluem estreptavidinibiotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente é luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H . Tais reagentes rotulados podem ser usados em diversos ensaios bem conhecidos, tais como radioimunoensaios, imunoensaios enzimáticos, por exemplo, ELISA, imunoensaios fluorescentes, e semelhantes. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. Nºs 3.766.162, 3.791.932, 3.817.837 e 4.233.402.

É também possível construir um anticorpo para ter atividade de ADCC aumentada. Em particular, a metade de terminal carboxi do domínio CH_2 é crítica para ADCC mediada através do receptor $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$. Uma vez que CH_2 e regiões de dobradiça têm um importante papel em funções efectoras, uma

séries de anticorpos de domínios múltiplos que contêm CH₂ extra e/ou regiões de dobradiça pode ser criada e investigada para quaisquer mudanças na potência efetora (veja, Greenwood, J., Gorman, S. D., Routledge, POR
5 EXEMPLO, Lloyd, I.S. & Waldmann, H., Ther Immunol. 1994 Oct;1(5):247-55). Uma abordagem alternativa pode ser a construção de domínios extra em paralelo, por exemplo, através da criação de dímeros por construção de uma cisteína na cadeia H de uma Ig quimérica (veja, Shopes B.
10 (1992) J. Immunol. 1992 1; 148(9): 2918-22). Além disso, mudanças para aumentar a atividade de ADCC podem ser construídas por introdução de mutações na região Fc (veja, por exemplo, US 6.737.056 B1), que expressa células em linhas de células deficientes de fucosil transferase (veja,
15 for exemplo, US2003/0115614), ou efetuando outras mudanças para a glicosilação do anticorpo (veja, por exemplo, US 6.602.684).

A presente invenção é especialmente vantajosa para o tratamento de cânceres e condições pré-malignas que
20 expressam CD40, em que um paciente é homozigótico ou heterozigótico para genótipo FcγRIIIa-158F.

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

propriedades de ligação exibidas pelo anticorpo monoclonal IDEC-C2B8 (Biogen IDEC Inc., Cambridge, MA).

Em algumas modalidades, o anticorpos anti-CD40 usado nos métodos da invenção exibe atividade terapêutica mais potente que o anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico IDEC-C2B8, em que a atividade terapêutica é avaliada com quantidades equivalentes desses anticorpos em um modelo de tumor de xenoenxerto de camundongo usando linhas de células de mieloma ou linfoma humanas. IDECC2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corp., San Diego, California; comercialmente disponível sob o nome comercial Rituxan®, também referido como rituximab) é um anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico que contém IgG1 humana e regiões constantes kapa com regiões variáveis de murídeo isoladas de um anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, IDEC-2B8 (Reff e cols. (1994) Blood 83:435-445). Rituxan® é licenciado para o tratamento de linfoma de célula B de baixo grau em recidiva ou linfoma não Hodgkin folicular (NHL). A descoberta de anticorpos com atividade terapêutica superior, em partícula antitumor, comparados a rituxan® pode melhorar drasticamente os métodos de terapia para cânceres e condições pré-malignas, como linfomas de cleula B, particularmente linfoma não Hodgkin de célula B.

Modelos de tumor de xenoenxerto de camundongo incluem aqueles que usam as linhas de células humanas de linfoma de Burkitt conhecidas como Namalwa e Daudi. Modalidades preferidas avaliam a atividade antitumor em um modelo de tumor de xenoenxerto de camundongo estagiado que usa a linha de células de linfoma humano Daudi como aqui descrito abaixo no Exemplo 7. Um modelos de tumor de xenoenxerto de

camundongo estagiado que usa using a linha de células de linfoma Daudi é mais eficaz na distinção da eficácia terapêutica de um anticorpo dado que é um modelo não estagiado, uma vez que a dosagem de anticorpo de modelo estagiado é iniciada apenas depois que o tumor tenha atingido um tamanho mensurável. No modelo não estagiado, a dosagem de anticorpo é iniciada geralmente em cerca de 1 dia de inoculação do tumor e antes de um tumor palpável estar presente. A capacidade de um anticorpo para superar Rituxan® (ou seja, para exibir atividade terapêutica aumentada) em um modelo estagiado é uma forte indicação de que o anticorpo será mais terapeuticamente eficaz que Rituxan®. Além disso, no modelo de Daudi, anti-CD20, o alvo para Rituxan® é expresso na superfície celular e um nível mais alto que é CD40.

Por "quantidade equivalente" do anticorpo anti-CD40 da invenção e Rituxan® entende-se que a mesma dose ou dose menor em mg é administrada com base no peso. Portanto, quando o anticorpo anti-CD40 é dosado a 0,01 mg/kg de peso corporal do camundongo usado no modelo, Rituxan® é também dosado a 0,01 mg/kg de peso corporal do camundongo. De modo similar, quando o anticorpo anti-CD40 é dosado a 0,1, 1, ou 10 mg/kg de peso corporal do camundongo usado no modelo, o Rituxan® é também dosado a 0,1, 1, ou 10 mg/kg, respectivamente, do peso corporal do camundongo.

Quando administrados no modelo de tumor de xenoenxerto de camundongo, alguns anticorpos anti-CD40 resultam em volume tumoral significativamente menor que uma quantidade equivalente de Rituxan®. Por exemplo, o anticorpo monoclonal totalmente humano CHIR-12.12 exibe um aumento de

pelo menos 20% na atividade anti-tumor em relação àquela observada com uma dose equivalente de Rituxan quando avaliado no modelo de tumor de xenoenxerto de camundongo estagiado usando a linha de células de linfoma humano Daudi na maneira descrita no Exemplo 7 nessa, e pode exibir um aumento de até 50% a 60% na atividade antitumoral nesse ensaio. Essa atividade antitumor aumentada é refletida na maior redução no volume tumoral observada com o anticorpo anti-CD40 da invenção quando comparado à dose equivalente de Rituxan® ou na indução de respostas mais completas. Portanto, por exemplo, dependendo da extensão do tempo após a inoculação do tumor, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 pode exibir um volume tumoral que é de cerca de um terço a cerca de metade daquele observado para uma dose equivalente de Rituxan®.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

j) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de

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

5 A presente invenção fornece um método para a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna tratável com um anticorpo anti-CD40, que compreende:

a) a identificação de um paciente humano com um
10 câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40; e

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

em que o referido câncer ou condição pré-maligna é
15 tratável com anticorpo anti-CD40 se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa 158F (genótipo V/F ou F/F). o câncer ou condição pré-maligna pode ser refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®).

Uma vez que um paciente humano com um câncer ou
20 condição pré-maligna tratável com um anticorpo anti-CD40 foi identificado, aquele paciente humano pode ser então tratado com um anticorpo anti-CD40. Assim, o método pode incluir a etapa adicional de (c) administração a um paciente humano identificado como heterozigótico ou
25 homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F) de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

Esse método de identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna tratável com um anticorpo
30 anti-CD40 pode ser facilmente realizado por uma pessoa

habilitada na técnica com o uso de um kit diagnóstico adequado. O kit deve compreender reagentes adequados para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano. Portanto, a invenção também fornece um kit para a
5 identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna tratável com um anticorpo anti-CD40, que compreende reagentes para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano. Kits adequados são descritos em maiores detalhes em outra parte nessa.

10 A invenção também fornece um método para seleção de uma terapia de anticorpo para tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna, que compreende:

(a) a identificação de um paciente humano que tem um
15 câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40; e

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

em que se o referido paciente humano é heterozigótico
20 ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento do referido câncer ou condição pré-maligna. O câncer ou condição pré-maligna pode ser refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®).

25 Uma vez que uma terapia com anticorpo anti-CD40 para tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna foi selecionado, aquele paciente humano pode ser então tratado com um anticorpo anti-CD40. Portanto, o método pode incluir a etapa adicional de (c)
30 administração a um paciente humano identificado como

heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F) de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

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

Por "tratável com um anticorpo anti-CD40" entende-se que o paciente humano (ou seja, um indivíduo com câncer ou condição pré-maligna), quando tratado com o anticorpo anti-CD40, deve se beneficiar de uma "resposta terapêutica positiva" (como definido em outra parte nessa) com relação ao câncer ou condição pré-maligna para qual o tratamento é pensado.

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

Por exemplo, a invenção fornece um kit para uso na determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano, que inclui um microarranjo que compreende pelo menos um marcador de 10 ou mais nucleotídeos de comprimento e de uma sequência adequada para a determinação de um

genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano. RNA ou DNA rotulado é hibridizado a marcadores complementares no arranjo e então detectados por rastreamento de laser. As intensidades de hibridização para cada marcador no arranjo são determinadas e convertidas a um valor quantitativo que representa níveis de expressão relativos do gene. A seleção de seqüências de marcador e comprimentos pode ser facilmente realizada por pessoa habilitada. A seqüência de nucleotídeos s que codificam os alótipos de FcγRIIIa-158 F e V é conhecida. Portanto, a pessoa habilitada pode selecionar marcadores que, sob as condições experimentais adequadas, permitam a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 das seqüências alvo.

Técnicas para a síntese desses arranjos que usam métodos de síntese mecânica são descritos, por exemplo, na Patente U.S. No. 5.384.261, aqui incorporada em sua totalidade por referência. Embora uma superfície de arranjo a plana seja preferida, o arranjo pode ser fabricado em uma superfície virtualmente de qualquer formato ou até mesmo em várias superfícies. Os arranjos podem ser peptídeos ou ácidos nucleicos em glóbulos, géis, superfícies poliméricas, fibras como fibras óticas, vidro ou qualquer outro substrato adequado, veja, Patentes U.S. Nos. 5.770.358, 5.789.162, 5.708.153, 6.040.193 e 5.800.992, cada uma dessas é aqui incorporada em sua totalidade para todos os objetivos. Os arranjos podem ser embalados em uma tal forma que permita o diagnóstico ou outra manipulação de um dispositivo completo. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5.856.174 e 5.922.591, aqui incorporadas por referência.

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

Um outro método para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano é o uso de um método baseado em ácido nucleico que detecta fragmentação de DNA que é característica do genótipo FcγRIIIa-158 do paciente humano's. Quando do uso de eletroforese em géis de agarose, DNA de cada genótipo de FcγRIIIa-158 tem um padrão característico. Portanto, a invenção também fornece um kit para uso na determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano, que compreende uma ou mais enzimas de restrição adequadas para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano. Enzimas de restrição adequadas são conhecidas na técnica (por exemplo, veja, Koene e cols., Blood, 1997, Vol. 90, No. 3, p. 1109-1114).

Os kits da invenção também podem incluir instruções

que indicam como usar o kit para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano. O kit também pode compreender, por exemplo, um agente de tamponamento, um conservante, ou um agente de estabilização de proteína.

5 Cada componente do kit pe comumente colocado em um recipiente individual, e todos os vários recipientes estão em um único pacote junto com instruções que indicam como usar o kit para a determinação de um genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

10 A invenção fornece o uso de anticorpos anti-CD40 na manufatura de medicamentos para o tratamento de câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD40, como descrito em outra parte nessa.

Os anticorpos anti-CD40 dessa invenção são
15 administrados em uma concentração que é terapeuticamente eficaz para evitar ou tratar um câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD40. Para atingir esse objetivo, os anticorpos podem ser formulados usando diversos veículos e/ou excipientes aceitáveis conhecidos na técnica. O anticorpo anti-CD40 pode ser
20 administrado por uma via de administração parenteral. Tipicamente, os anticorpos são administrados por injeção, por via tanto intravenosa quanto subcutânea. Métodos para se obter essa administração são conhecidos por aqueles
25 habilitados na técnica.

A administração intravenosa ocorre preferivelmente por infusão ao longo de um período de cerca de meia hora a 1 hora a cerca de 10 horas (menos que 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 horas). As infusões subseqüentes podem ser
30 administradas ao longo de um período de cerca de 1 a cerca

de 6 horas, incluindo, por exemplo, cerca de 1 a cerca de 4 horas, cerca de 1 a cerca de 3 horas ou cerca de 1 a cerca de 2 horas ou menos que uma hora. Alternativamente, a dose pode ser administrada por via subcutânea.

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

20 Os anticorpos anti-CD40 são fornecidos tipicamente por técnica-padrão dentro de um tampão farmacêuticamente aceitável, por exemplo, soro fisiológico estéril, água tamponada estéril, combinações dos anteriores etc. Métodos para a preparação de agentes administráveis por via
25 parenteral são descritos em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), aqui incorporado por referência. Veja também, por exemplo, WO 98/56418, que descreve formulações farmacêuticas estabilizadas de anticorpo adequadas para uso
30 nos métodos da presente invenção.

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

Para uma dose única de anticorpo anti-CD40 a ser administrada está na faixa de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg.

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

O tratamento de um indivíduo com uma quantidade

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

Em um exemplo, um indivíduo é tratado com anticorpo anti-CD40, na faixa entre cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso
20 corporal, uma vez por semana, por cerca de 1 a 10 semanas, preferivelmente entre cerca de 2 a 8 semanas, mais preferivelmente entre cerca de 3 a 7 semanas e, ainda mais preferivelmente, por cerca de 4, 5 ou 6 semanas. O tratamento pode ocorrer em intervalos de a cada 2 a 12
25 meses para a prevenção de recidivas, ou mediante uma indicação de recidiva. Será também observado que a dosagem eficaz de anticorpo usada para tratamento pode aumentar ou diminuir ao longo de uma série de tratamento em particular. Alterações na dosagem podem resultar e se tornar aparentes
30 a partir dos resultados de ensaios diagnósticos, como aqui

descrito.

Portanto, em uma modalidade, o regime de dosagem inclui uma primeira administração de uma dose terapêuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 nos dias 1, 8, 15 e 22 de um período de tratamento.

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

Em outras modalidades, a dose terapêuticamente eficaz inicial de um anticorpo anti-CD40 como aqui definida em outra seção, pode estar na faixa de dosagem mais baixa (ou seja, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg) com doses subsequentes se situando dentro da faixa de dosagem mais elevada (ou seja, de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg).

Em modalidades alternativas, a dose terapêuticamente

eficaz inicial de um anticorpo anti-CD40 como aqui definida em outra seção, pode estar na faixa de dosagem mais alta (ou seja, cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg) com doses subseqüentes se situando dentro da faixa de dosagem mais baixa (ou seja, de cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg). Portanto, em algumas modalidades da invenção, a terapia com anticorpo anti-CD40 é iniciada pela administração de uma "dose de ataque" do anticorpo ao indivíduo que necessita de terapia. Por "dose de ataque" entende-se uma dose inicial do anticorpo anti-CD40 que é administrada ao indivíduo, em que a dose do anticorpo administrada se situa dentro da faixa de dosagem mais elevada (ou seja, de cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg). A "dose de ataque" pode ser administrada como uma administração única, por exemplo, uma infusão única na qual o anticorpo ou o fragmento de ligação de antígeno deste é administrado IV, ou como administrações múltiplas, por exemplo, infusões múltiplas nas quais o anticorpo é administrado IV, desde que a "dose de ataque" completa seja administrada aproximadamente dentro de um período de 24 horas. Após a administração da "dose de ataque", o indivíduo recebe então uma ou mais doses terapêuticamente eficazes adicionais do anticorpo antagonista anti-CD40. Doses terapêuticamente eficazes subseqüentes podem ser administradas, por exemplo, de acordo com um esquema de dosagem semanal, ou uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas. Nessas modalidades, as doses terapêuticamente eficazes subseqüentes geralmente se situam dentro da faixa de dosagem mais baixa (ou seja, 0,3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg).

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

Os anticorpos anti-CD40 presentes nas composições farmacêuticas aqui descritas para uso nos métodos da invenção podem ser nativos ou obtidos por técnicas recombinantes, e podem ser de qualquer fonte, incluindo fontes mamíferas, tais como, por exemplo, camundongo, rato, coelho, primata, porco e humana. Preferivelmente, tais

polipeptídeos são derivados de uma fonte humana e, mais preferivelmente, são recombinantes, proteínas humanas de linhas de células de hibridoma.

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

Qualquer composição farmacêutica que compreenda um anticorpo anti-CD40 possuindo as propriedades de ligação
10 aqui descritas como o componente terapeuticamente ativo pode ser usada nos métodos da invenção. Desse modo, composições líquidas, liofilizadas ou secas por vaporização que compreendem um ou mais dos anticorpos anti-CD40 da invenção podem ser preparadas como uma solução ou suspensão
15 aquosa ou não aquosa para administração subsequente a um indivíduo de acordo com os métodos da invenção. Cada uma dessas composições compreenderá pelo menos um dos anticorpos anti-CD40 como um componente terapêutica ou profilaticamente ativo. Por "componente terapêutica ou
20 profilaticamente ativo" significa que o anticorpo anti-CD40 é especificamente incorporado na composição para produzir uma resposta terapêutica ou profilática desejada com relação ao tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou condição em um indivíduo quando a composição
25 farmacêutica é administrada àquele indivíduo. Preferivelmente, as composições farmacêuticas compreendem agentes estabilizantes apropriados, agentes de volume, ou ambos, para minimizar problemas associados à perda de estabilidade da proteína e da atividade biológica durante a
30 preparação e estocagem.

Podem ser adicionados formulantes às composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo anti-CD40 da invenção. Esses formulantes podem incluir, sem limitação, óleos, polímeros, vitaminas, carboidratos, aminoácidos, sais, tampões, albumina, tensoativos ou agentes de volume. Preferivelmente, carboidratos incluem açúcar ou álcoois de açúcar, tais como mono-, di- ou polissacarídeos ou glicanos hidrossolúveis. Os sacarídeos ou glicanos podem incluir frutose, glicose, manose, sorbose, xilose, maltose, sacarose, dextrana, pululana, dextrina, α , β e γ ciclodextrina, amido solúvel, amido de hidroxietila e carboximetilcelulose, ou misturas destes. "Álcool de açúcar" é definido como um hidrocarboneto C_4 a C_5 com um grupo hidroxila, e inclui galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol e arabitól. Esses açúcares ou álcoois de açúcar podem ser usados individualmente ou em combinação. A concentração de açúcar ou álcool de açúcar é entre 1,0% e 7% p/v, mais preferivelmente entre 2,0% e 6,0% p/v. Preferivelmente, aminoácidos incluem formas levóginas (L) de carnitina, arginina e betaína; no entanto, podem ser adicionados outros aminoácidos. Polímeros preferidos incluem polivinilpirrolidona (PVP) com um peso molecular médio entre 2.000 e 3.000, ou polietileno glicol (PEG) com um peso molecular médio entre 3.000 e 5.000. Tensoativos que podem ser adicionados à formulação são mostrados nas EP N^{os} 270.799 e 268.110.

Adicionalmente, os anticorpos podem ser modificados quimicamente por conjugação covalente a um polímero para aumentar sua meia-vida na circulação, por exemplo. Polímeros preferidos e métodos para anexá-los aos peptídeos

são mostrados nas Patentes U.S. Nºs 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; e 4.609.546; as quais são aqui incorporadas por referência em suas totalidades. Polímeros preferidos são polióis polioxietilados e polietileno glicol (PEG). PEG é solúvel em água em temperatura ambiente e tem a fórmula geral: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, em que R pode ser hidrogênio, ou um grupo de proteção como, por exemplo, um grupo alquil ou alcanol. Preferivelmente, o grupo de proteção tem entre 1 e 8 carbonos, mais preferivelmente é metil. O símbolo n é um número inteiro positivo, preferivelmente entre 1 e 1.000, mais preferivelmente entre 2 e 500. O PEG tem um peso molecular médio preferido entre 1.000 e 40.000, mais preferivelmente entre 2.000 e 20.000, principalmente entre 3.000 e 12.000. Preferivelmente, PEG tem pelo menos um grupo hidroxil, mais preferivelmente é um grupo hidroxil terminal. É esse grupo hidroxil que é preferivelmente ativado para reagir com um grupo amino livre no inibidor. No entanto, será compreendido que o tipo e a quantidade dos grupos reativos podem ser variados para se obter um PEG/anticorpo conjugado de forma covalente da presente invenção.

Polióis polioxietilados hidrossolúveis também são úteis na presente invenção. Eles incluem sorbitol polioxietilado, glicose polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), e semelhantes. POG é preferido. Uma razão é porque a estrutura central do glicerol do glicerol polioxietilado é a mesma estrutura central de ocorrência natural, por exemplo, em animais e humanos em mono-, di-, triglicerídeos. Portanto, essa ramificação não seria necessariamente vista como um agente estranho no corpo. O

POG tem um peso molecular preferido na mesma faixa que o de PEG. A estrutura para POG é mostrada em Knauf e cols. (1988) *J. Bio. Chem.* 263:15.064-15.070, e uma discussão de conjugados de POG/IL-2 é encontrada na Patente U.S. N° 4.766.106, ambos aqui incorporados por referência em suas totalidades.

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

Os formulantes a serem incorporados em uma composição farmacêutica devem fornecer a estabilidade do anticorpo anti-CD40. Ou seja, o anticorpo anti-CD40 deve reter sua estabilidade física e/ou química e ter a atividade biológica desejada, ou seja, uma ou mais das atividades antagonistas aqui definidas anteriormente, incluindo, sem limitação, inibição da secreção de imunoglobulina por células B periféricas humanas normais estimulada por células T; inibição da sobrevivência e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimulada por células T de Jurkat; inibição da sobrevivência e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimulada por células que expressam CD40L ou ligante CD40 solúvel (sCD40L); inibição de sinais intracelulares

antiapoptóticos de "sobrevida" em qualquer célula estimulada por sCD40L ou CD40L de fase sólida; inibição da transmissão do sinal de CD40 em qualquer célula mediante ligação com sCD40L ou CD40L de fase sólida; e inibição da
5 proliferação de células B humanas malignas, como observado em outra seção desta especificação.

Métodos para o monitoramento da estabilidade da proteína são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed.
10 (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., Nova York, Nova York) ; e os ensaios de estabilidade aqui revelados abaixo. Geralmente, a estabilidade da proteína é medida em uma temperatura escolhida por um período de tempo especificado. Em modalidades preferidas,
15 uma formulação farmacêutica de anticorpo estável fornece estabilidade do anticorpo anti-CD40 quando estocada em temperatura ambiente (cerca de 25°C) por pelo menos 1 mês, pelo menos 3 meses ou, pelo menos, 6 meses, e/ou é estável em cerca de 2-8°C por pelo menos 6 meses, pelo menos 9
20 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses.

Uma proteína como um anticorpo, quando formulada em uma composição farmacêutica, é considerada como retendo sua estabilidade física em certo momento caso ela não mostre
25 sinais visuais (ou seja, descoloração ou perda de transparência) ou sinais mensuráveis (por exemplo, com o uso de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) ou dispersão da luz UV) de precipitação, agregação e/ou desnaturação naquela composição farmacêutica. Com relação à
30 estabilidade química, uma proteína como um anticorpo,

quando formulada em uma composição farmacêutica, é considerada como retendo sua estabilidade química em certo momento se as medidas da estabilidade química forem indicativas de que a proteína (ou seja, o anticorpo) retém a atividade biológica de interesse naquela composição farmacêutica. Métodos para o monitoramento das alterações na estabilidade química são bem conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, métodos para detectar quimicamente formas alteradas da proteína resultantes de picotes, usando, por exemplo, SDS-PAGE, SEC e/ou ionização por dessorção da matriz assistida por laser/espectrometria de massa por tempo de voo; e degradação associada às alterações na carga molecular (por exemplo, associada à desamidação), usando, por exemplo, cromatografia por troca iônica. Veja, por exemplo, os métodos aqui revelados abaixo.

Um anticorpo anti-CD40 quando formulado em uma composição farmacêutica, é considerado como retendo uma atividade biológica desejada em certo momento se a atividade biológica desejada naquele momento for de cerca de 30%, preferivelmente for de cerca de 20% da atividade biológica desejada exibida no momento em que a composição farmacêutica foi preparada, como determinado em uma análise adequada para a atividade biológica desejada. Análises para a medida da atividade biológica desejada dos anticorpos anti-CD40 aqui revelados podem ser realizadas como descrito nos Exemplos aqui apresentados. Veja também os ensaios descritos em Schultze e cols. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8.200-8.204; Denton e cols. (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans e cols. (2000). *J. Immunol.*

164:688-697; Noelle (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman e cols. (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan e cols. (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom e cols. (1993) *Immunology* 79:439-444; e nas Patentes U.S. Nºs 5.674.492 e 5.847.082, aqui incorporadas por referência.

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

Quando o anticorpo anti-CD40 é estocado antes de sua formulação, ele pode ser congelado, por exemplo, a $\leq 20^{\circ}\text{C}$, e então descongelado em temperatura ambiente para posterior formulação. A formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40. A quantidade de anticorpo presente na formulação leva em consideração a via de administração e o volume de dose desejado.

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

Qualquer tampão adequado que mantenha o pH da formulação líquida de anticorpo anti-CD40 na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0 pode ser usado na formulação, desde que a estabilidade físico-química e atividade biológica desejada do anticorpo sejam retidas como apontado acima. Tampões adequados incluem, sem limitação, ácidos

convencionais e sais desses, em que o contra-íon pode ser, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio, ou magnésio. Exemplos de ácidos convencionais e sais desses que podem ser usados para tamponar a formulação farmacêutica líquida incluem, sem limitação, tampões de ácido succínico ou succinato, ácido cítrico ou citrato, ácido acético ou acetato, ácido tartárico ou tartarato, ácido fosfórico ou fosfato, ácido glucônico ou gluconato, ácido glutâmico ou glutamato, ácido aspártico ou aspartato, ácido maleico ou maleato, e ácido málico ou malato. A concentração do tampão na formulação pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, incluindo cerca de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, ou outros valores na faixa de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, a concentração do tampão na formulação é de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, incluindo cerca de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, ou outros valores na faixa de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM.

Em algumas modalidades da invenção, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 e tampão de succinato ou tampão de citrato em uma concentração que mantém o pH da formulação na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, preferivelmente cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5. por "tampão de succinato" ou "tampão de citrato" entende-se um tampão que compreende um sal de ácido succínico ou um sal de ácido cítrico, respectivamente. Em uma modalidade preferida, o contra-íon de succinato ou citrato é o cátion sódio, e assim o tampão é succinato de

sódio ou citrato de sódio, respectivamente. No entanto, qualquer cátion deve ser eficaz. Outros cátions de succinato ou citrato possíveis incluem, sem limitação, potássio, amônio, cálcio, e magnésio. Como acima observado, a concentração do tampão de succinato ou citrato na formulação pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, incluindo cerca de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, ou outros valores na faixa de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, a concentração de tampão na formulação é de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, incluindo cerca de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, ou cerca de 15 mM. Em outras modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreendo anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml, ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, e tampão de succinato ou citrato, por exemplo, tampão de succinato de sódio ou citrato de sódio, em uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, preferivelmente cerca de 10 mM.

Quando é desejável para a formulação farmacêutica líquida que seja próxima de isotônica, a formulação farmacêutica líquida que compreendo anticorpo anti-CD40 e um tampão pode compreender também uma quantidade de uma agente de isotonicidade suficiente para tornar a formulação próxima de isotônica. Por "próxima de isotônica" entende-se que a formulação aquosa tem uma osmolaridade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360 mmol/kg, preferivelmente cerca de 240 a cerca de 340 mmol/kg, mais preferivelmente cerca de 250 a cerca de 330 mmol/kg, ainda mais preferivelmente

cerca de 260 a cerca de 320 mmol/kg, still mais preferivelmente cerca de 270 a cerca de 310 mmol/kg. Métodos de determinação da isotonicidade de uma solução são conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Veja, por exemplo, Setnikar e cols. (1959) J Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Aqueles habilitados na técnica estão familiarizados com vários solutos farmacêuticamente aceitáveis úteis em fornecer isotonicidade em composição farmacêuticas. O agente de isotonicidade pode ser qualquer reagente capaz de ajustar a pressão osmótica de uma formulação farmacêutica líquida da presente invenção a um valor quase igual àquele de um fluido corporal. É desejável usar um agente de isotonicidade fisiologicamente aceitável. Portanto, a formulação farmacêutica líquida que compreende a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 e um tampão também pode compreender componentes que podem ser usados para fornecer isotonicidade, por exemplo, cloreto de sódio; aminoácidos como alanina, valina, e glicina; açúcares e álcoois de açúcares (polióis), incluindo, sem limitação, glicose, dextrose, frutose, sacarose, maltose, manitol, trehalose, glicerol, sorbitol, e xilitol; ácido acético, outros ácidos orgânicos ou seus sais, e quantidades relativamente menores de citratos ou fosfatos. A pessoa de habilidade comum é ciente de agentes adicionais que são adequados para fornecer tonicidade ótima da formulação líquida.

Em algumas modalidades preferidas, a formulação farmacêutica líquida que compreende um anticorpo anti-CD40 e um tampão também compreende cloreto de sódio como o

agente de isotonicidade. A concentração de cloreto de sódio na formulação dependerá da contribuição de outros componentes para a tonicidade. Em algumas modalidades, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 50 mM a
5 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
10 de 100 mM a cerca de 150 mM, cerca de 125 mM a cerca de 175 mM, cerca de 125 mM a cerca de 150 mM, cerca de 130 mM a cerca de 170 mM, cerca de 130 mM a cerca de 160 mM, cerca de 135 mM a cerca de 155 mM, cerca de 140 mM a cerca de 155 mM, ou cerca de 145 mM a cerca de 155 mM. Em uma tal
15 modalidade, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM. Em outra modalidades, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM, o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio em uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, a formulação farmacêutica líquida
20 compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 e a formulação tem um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5. Em outras modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreende o
25 anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, cerca de 150 mM de cloreto de sódio, e cerca de 10 mM de succinato de sódio ou citrato de sódio, em um pH de cerca de pH 5,5.

30 A degradação de proteína devida a

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

Tensoativos típicos empregados são tensoativos não iônicos, incluindo ésteres de polioxietileno sorbitol como polissorbato 80 (Tween 80) e polissorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno como Pluronic F68; álcoois de polioxietileno como Brij 35; simeticona; polietileno glicol such as PEG400; lisofosfatidilcolina; e polioxietileno-p-t-octilfenol como Triton X-100. A estabilização clássica de fármacos por tensoativos ou emulsificantes é descrita, por exemplo, em Levine e cols. (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45(3):160-165, aqui incorporado por referência. Um tensoativo preferido empregado na prática da presente invenção é polissorbato 80. Quando um tensoativo é incluído, ele é tipicamente adicionado em uma quantidade de cerca de 0,001 % a cerca de 1,0% (w/v), cerca de 0,001% a cerca de 0,5%, cerca de 0,001% a cerca de 0,4%, cerca de 0,001% a cerca de 0,3%, cerca de 0,001% a cerca de 0,2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5%, cerca de 0,005% a cerca de 0,2%, cerca de 0,01% a cerca de 0,5%, cerca de 0,01% a cerca de 0,2%, cerca de

0,03% a cerca de 0,5%, cerca de 0,03% a cerca de 0,3%,
cerca de 0,05% a cerca de 0,5%, ou cerca de 0,05% a cerca
de 0,2%.

Portanto, em algumas modalidades, a formulação
5 farmacêutica líquida compreende uma quantidade
terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40, o tampão é
succinato de sódio ou citrato de sódio em uma concentração
de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, cerca de 5 mM a cerca de
25 mM, ou cerca de 5 mM a cerca de 15 mM; a formulação tem
10 um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0
a cerca de pH 6,0, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5; e
a formulação também compreende um tensoativo, por exemplo,
polissorbato 80, em uma quantidade de cerca de 0,001% a
cerca de 1,0% ou cerca de 0,001% to cerca de 0,5%. Tais
15 formulações podem compreender opcionalmente um agente de
isotonicidade, como cloreto de sódio em uma concentração de
cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, cerca de 50 mM a cerca de
200 mM, ou cerca de 50 mM a cerca de 150 mM. Em outras
modalidades, a formulação farmacêutica líquida compreendo
20 anticorpo anti-CD40 em uma concentração de cerca de 0,1
mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca
de 25,0 mg/ml, incluindo cerca de 20,0 mg/ml; cerca de 50
mM a cerca de 200 mM de cloreto de sódio, incluindo cerca
de 150 mM de cloreto de sódio; succinato de sódio ou
25 citrato de sódio a cerca de 5 mM a cerca de 20 mM,
incluindo cerca de 10 mM de succinato de sódio ou citrato
de sódio; cloreto de sódio em uma concentração de cerca de
50 mM a cerca de 200 mM, incluindo cerca de 150 mM; e
opcionalmente um tensoativo, por exemplo, polissorbato 80,
30 em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0%,

incluindo cerca de 0,001% a cerca de 0,5%; em que a
formulação farmacêutica líquida tem um pH de cerca de pH
5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0,
cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, cerca de pH 5,5 to cerca
5 de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0.

A formulação farmacêutica líquida pode ser
essencialmente livre de quaisquer conservantes e outros
veículos, excipientes, ou estabilizantes apontados acima.
Alternativamente, a formulação pode incluir um ou mais
10 conservantes, por exemplo, agentes antibacterianos,
veículos farmacêuticamente aceitáveis, excipientes, ou
estabilizantes acima descritos desde que eles não afetam de
forma adversa a estabilidade físico-química do anticorpo
anti-CD40. Exemplos de veículos aceitáveis, excipientes, e
15 estabilizantes incluem, sem limitação, agentes de
tamponamento adicionais, co-solventes, tensoativos,
antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina,
agentes quelantes como EDTA, complexos de metal (por
exemplo, complexos Zn-proteína), e polímeros biodegradáveis
20 como poliésteres. Uma discussão da formulação e seleção de
veículos farmacêuticamente aceitáveis, estabilizantes, e
isomolitos pode ser encontrada em Remington's
Pharmaceutical Sciences (18th ed.; Mack Publishing Company,
Eaton, Pennsylvania, 1990), aqui incorporada por
25 referência.

"Veículos", como aqui usados, incluem veículos,
excipientes ou estabilizadores farmacêuticamente
aceitáveis, que são atóxicos para a célula ou mamífero que
está sendo exposto a ele nas dosagens e concentrações
30 empregadas. Frequentemente, o veículo fisiologicamente

aceitável é uma solução aquosa com pH tamponado. Exemplos de veículos fisiologicamente aceitáveis incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipeptídeos com
5 baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos de aminoácidos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como, por exemplo, polivinilpirrolidona; aminoácidos, tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina;
10 monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos, incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como, por exemplo, EDTA; álcoois de açúcar, tais como manitol ou sorbitol; contra-íons formadores de sal como, por exemplo, sódio; e/ou tensoativos não iônicos como, por
15 exemplo, TWEEN, polietileno glicol (PEG) e Plurônicos.

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

Depois de a formulação farmacêutica líquida ou outra
20 composição farmacêutica aqui descrita ser preparada, ela pode ser liofilizada para evitar degradação. Métodos para a liofilização de composições líquidas são conhecidos para aqueles habilitados na técnica. Imediatamente antes de ser utilizada, a composição pode ser reconstituída com um
25 diluente estéril (solução de Ringer, água destilada ou soro fisiológico estéril, por exemplo) que pode incluir ingredientes adicionais. Com a reconstituição, a composição é administrada preferivelmente aos indivíduos com o uso daqueles métodos que são conhecidos por aqueles habilitados
30 na técnica.

Em algumas modalidades, o anticorpos anti-CD40 pode ser administrado em combinação com pelo menos uma outra terapia conhecida para câncer, incluindo, sem limitação cirurgia, terapia por radiação, quimioterapia, terapia com citocina ou outro anticorpo monoclonal destinado a ser utilizado no tratamento do tumor sólido de interesse, em que a terapia para câncer adicional é administrada antes, durante ou subseqüentemente à terapia com anticorpo anti-CD40. Desse modo, quando as terapias combinadas compreenderem a administração de um anticorpo anti-CD40 em combinação com a administração de outro agente terapêutico como com quimioterapia, terapia com citocina ou outro anticorpo monoclonal, os métodos da invenção englobarão a co-administração, usando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, ou a administração consecutiva em qualquer ordem, em que preferivelmente há um período de tempo em que ambos agentes ativos (ou todos) exercem simultaneamente suas atividades terapêuticas. Quando os métodos da presente invenção compreende regimes terapêuticos combinados, essas terapias poderão ser dadas simultaneamente, ou seja, o anticorpo anti-CD40 é administrado concomitantemente ou dentro do mesmo intervalo de tempo que a outra terapia para câncer (ou seja, as terapias acontecem concomitantemente, mas o anticorpo anti-CD40 não é administrado precisamente ao mesmo tempo que a outra terapia para câncer). Alternativamente, o anticorpo anti-CD40 da presente invenção também pode ser administrado antes ou subseqüentemente à outra terapia de câncer. A administração seqüencial das diferentes terapias anticancerígenas pode ser realizada independentemente do

fato de o indivíduo tratado responder à primeira série de terapia para diminuir a possibilidade de remissão ou recidiva. Quando as terapias combinadas compreenderem a administração do anticorpo anti-CD40 em combinação com
5 administração de um agente citotóxico, preferivelmente o anticorpo anti-CD40 é administrado antes da administração do agente citotóxico.

Dessa maneira, os anticorpos anti-CD40 são administrados em combinação com pelo menos uma outra
10 terapia para câncer, incluindo, sem limitação, cirurgia, ou procedimentos cirúrgicos (por exemplo, esplenectomia, hepatectomia, linfadenectomia, leucoforese, transplante de células, e outros), terapia por radiação, quimioterapia, opcionalmente em combinação com transplante autólogo de
15 medula óssea, em que agentes quimioterápicos adequados incluem, sem limitação, fludarabina ou fosfato de fludarabina, clorambucil, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona, e combinações destes, por
20 exemplo, regimes contendo antraciclina, tais como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina mais prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mais doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, mais dexametasona), MP (melfalan mais prednisona), e outros
25 agentes citotóxicos e/ou terapêuticos usados em quimioterapia, tais como mitoxantrona, daunorrubicina, idarrubicina, asparaginase, e antimetabólitos, incluindo, sem limitação, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracil decarbazina, 6- tioguanina, 6-mercaptopurina, e nelarabina;
30 outra terapia anticancerígena com anticorpo monoclonal (por

exemplo, alemtuzumab (Campath®) ou outro anticorpo anti-CD52 que tem como alvo a glicoproteína da superfície celular CD52 em células B malignas); rituximab (Rituxan®), o anticorpo totalmente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, 5 TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), ou qualquer outro anticorpo terapêutico anti-CD20 que tem como alvo o antígeno CD20 em células B malignas; anticorpo anti-CD19 (por exemplo, MT103, um anticorpo bi-específico); anticorpo 10 anti-CD22 (por exemplo, o anticorpo humanizado monoclonal epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) ou outro anticorpo anticancerígeno que tem como alvo fator de crescimento endotelial vascular humano; anticorpo anti-CD22 que tem como alvo o antígeno CD22 em células B malignas (por 15 exemplo, o anticorpo monoclonal BL-22, uma toxina alfa-CD22); anticorpo α -M-CSF que tem como alvo fator estimulante de colônia de macrófagos; anticorpos que têm como alvo o ativador do receptor do fator-kappa-B nuclear (RANK) e seu ligante (RANKL), que são hiper-expressos no 20 mieloma múltiplo; anticorpo anti-CD23 que tem como alvo o antígeno CD23 em células B malignas (por exemplo, IDEC-152); anti-CD80 anticorpo que tem como alvo o antígeno CD80 (por exemplo, IDEC-114); anticorpo anti-CD38 que tem como alvo o antígeno CD38 em células B malignas; anticorpos que 25 têm como alvo receptores principais do complexo de histocompatibilidade de classe II (anticorpos anti-MHC) expressos em células B malignas; outros anticorpos anti-CD40 que têm como alvo o antígeno CD40 em células B malignas (por exemplo, SGN-40); e anticorpos que têm como 30 alvo o receptor 1 do ligante indutor de apoptose

relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL-R1) (por exemplo, o anticorpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1) e TRAIL-R2 expresso em diversos tumores sólidos e em tumores de origem hematopoiética); terapia anticancerígena baseada em molécula pequena, incluindo, sem limitação, inibidores de microtúbulo e/ou da topoisomerase (por exemplo, o inibidor mitótico dolastatina e análogos de dolastatina; o agente de ligação à tubulina T900607; XL119; e o inibidor de topoisomerase aminocamptotecina), SDX-105 (hidroclorato de bendamustina), ixabepilona (um análogo de epotilona, também denominado BMS-247550), inibidores da proteína quinase C, por exemplo, midostaurina ((PKC-412, CGP 41251 N-benzoilstaurosporina), pixantrona, eloxatin (um agente antineoplásico), ganite (nitrato de gálio), Thalomid® (talidomida), derivados imunomoduladores de talidomida (por exemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inibidor anti-senso de proteína quinase C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, que induz apoptose de linfócitos malignos), análogos de segunda geração do nucleosídeo purina como, por exemplo, clofarabina, inibidores da produção da proteína Bcl-2 por células cancerosas (por exemplo, os agentes anti-senso oblimersen e Genasense®), inibidores do proteassoma (por exemplo, Velcade™ (bortezomib)), inibidores de molécula pequena de quinase (por exemplo, CHIR-258), inibidores de molécula pequena de VEGF (por exemplo, ZD-6474), inibidores de molécula pequena de proteína de choque térmico (HSP) 90 (por exemplo, 17-AAG), inibidores de molécula pequena de histona desacetilases (por exemplo, citodiferenciação híbrida/polar HPC) agentes tais como o ácido suberanilohidroxâmico (SAHA) e FR-901228) e agentes

apoptóticos tais como Trisenox® (trióxido arsênico) e Xcytrin® (motexafin gadolínio); terapias anticancerígenas baseadas em vacina/imunoterapia, incluindo, sem limitação, abordagens de vacinas (por exemplo, Id-KLH, oncofago, 5 vitaletina), imunoterapia personalizada ou imunoterapia ativa em idiótipo (por exemplo, Imunoterapia Personalizada MyVax®, chamada anteriormente GTOP-99), Promune® (CpG 7909, a agonista sintético para receptor 9 *toll-like* (TLR9)), terapia com interferon-alfa, terapia com interleucina-2 10 (IL-2), terapia com IL-12, terapia com IL-15 e terapia com IL-21; terapia com esteróide; ou outra terapia anticancerígena; em que a terapia anticancerígena adicional é administrada antes, durante ou subsequente à terapia com anticorpo antagonista anti-CD40.

15 Em uma modalidade, os anticorpos anti-CD40 são administrados em combinação com bortezomib (VELCADE®), em particular para o tratamento de mieloma múltiplo. WO 2005/044855 A2 revela que a combinação de CHIR-12.12 com tratamento de bortezomib aumenta a eficácia da inibição do 20 crescimento tumoral em modelos experimentais de mieloma múltiplo.

Em uma modalidade, os anticorpos anti-CD40 são administrados em combinação com IL-2, em particular para o tratamento de linfoma de célula B. WO 2005/044294 A2 revela 25 que a combinação de CHIR-12.12 com tratamento de IL-2 resultou em atividade antitumor aditiva contra tumores de Namalwa.

Portanto, a invenção fornece o uso de uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo 30 anti-CD40 na manufatura de um medicamento para o

tratamento de um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), em que o medicamento é coordenado com tratamento com pelo menos uma outra terapia para câncer.

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

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

Por "pré-tratado" ou "pré-tratamento" significa que o indivíduo recebeu uma ou mais outras terapias para câncer (ou seja, foi tratado com pelo menos uma outra terapia para câncer), antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo anti-CD40. "Pré-tratado" ou "pré-tratamento" inclui indivíduos que foram tratados com pelo menos uma outra terapia para câncer em um intervalo de 2 anos, em um intervalo de 18 meses, em um intervalo de 1 ano, em um intervalo de 6 meses, em um intervalo de 2 meses, em um intervalo de 6 semanas, em um intervalo de 1 mês, em um intervalo de 4 semanas, em um intervalo de 3 semanas, em um intervalo de 2 semanas, em um intervalo de 1 semana, em um intervalo de 6 dias, em um intervalo de 5 dias, em um

intervalo de 4 dias, em um intervalo de 3 dias, em um intervalo de 2 dias, ou até mesmo em um intervalo de 1 dia, antes do início do tratamento com o medicamento que compreende o anticorpo anti-CD40. Não é necessário que o indivíduo tenha respondido ao pré-tratamento com a terapia para câncer anterior, ou com as terapias anteriores. Desse modo, o indivíduo que recebe o medicamento que compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 poderia ter respondido ou não (ou seja, o câncer foi refratário), ao pré-tratamento com a terapia para câncer anterior, ou a uma ou mais das terapias para câncer anteriores, em que o pré-tratamento compreendeu múltiplas terapias para câncer. Exemplos de outras terapias para câncer para as quais um indivíduo pode ter recebido pré-tratamento antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo anti-CD40 incluem, sem limitação, cirurgia; terapia por radiação; quimioterapia, opcionalmente em combinação com transplante autólogo de medula óssea, em que agentes quimioterápicos adequados incluem, sem limitação, aqueles aqui descritos e em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294; outra terapia com anticorpo monoclonal anticâncer, incluindo, sem limitação, aqueles anticorpos anticâncer aqui descritos e em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO 2005/044294; terapia de câncer com base em molécula pequena, incluindo, sem limitação, as moléculas pequenas aqui descritas e em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307, e WO

2005/044294; terapias para câncer com base em vacina/imunoterapia, incluindo, sem limitação, aquelas aqui descritas e em WO 2005/044854, WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 5 2005/044307, e WO 2005/044294; terapia com esteróide; outra terapia para câncer; qualquer combinação desses.

"Tratamento", no contexto do uso coordenado de um anticorpo anti-CD40 com uma ou mais de outras terapias para câncer, é aqui definido como a aplicação ou administração 10 do anticorpo anti-CD40 ou da outra terapia para câncer a um indivíduo, ou a aplicação ou administração a um tecido isolado ou linha de células de um paciente, em que o paciente tem uma doença, um sintoma de uma doença, ou uma predisposição para o desenvolvimento de uma doença, em que 15 o objetivo é o de curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, ou afetar a doença, os sintomas da doença, ou a predisposição em relação ao desenvolvimento da doença. Por "tratamento" também entende-se a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende 20 o anticorpo anti-CD40 ou outra terapia para câncer a um paciente, ou a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo anti-CD40 ou outra terapia para câncer a um tecido ou linha de células isolada de um paciente, que tem uma doença, um sintoma de 25 uma doença ou uma predisposição para ter uma doença, em que a finalidade seja a curar, cicatrizar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, ou afetar a doença, os sintomas da doença ou a predisposição para a doença.

Em algumas modalidades, a terapia de combinação 30 fornece uma melhoria sinérgica na eficácia terapêutica em

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

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

EXPERIMENTAL

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

Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] sob o número de Depósito de Patente PTA-5543.

Exemplo 1: Análise de ADCC em linhas de células

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

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

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

A atividade de ADCC relativa de CHIR-12.12 e rituximab
25 contra células de CLL primária ex vivo de 8 pacientes foi comparada. CHIR-12.12 exibiu maior ADCC que rituximab contra CLL de todos os pacientes (veja, Figura 2A-D e Figura 3). Os percentuais médios de lise máxima por CHIR-12.12 e rituximab foram de $49 \pm 16\%$ e $31 \pm 14\%$,
30 respectivamente. CHIR12.12 foi mais que 10 vezes mais

potente que rituximab, como medido por valores de ED₅₀ (14,1 µM versus 155,5 µM, respectivamente).

Desenho de experimento de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)

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

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

alvo (CD20 e CD40), a extensão da internalização do anticorpo, e a afinidade do anticorpo para o receptor de FcγIIIa em células NK. Portanto, a influência desses fatores na atividade de ADCC de CHIR12.12 e rituximab foi
5 investigada.

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

A densidade quantitativa de CD20 e CD40 em células de CLL (Exemplo 3) e o grau de internalização de anticorpo
10 (Exemplo 4) foram investigados como razões potenciais para a diferença acima descrita na atividade de ADCC. A atividade relativa de ADCC de CHIR-12.12 e rituximab contra células de CLL primárias ex vivo de 9 pacientes foi comparada. CHIR-12.12 exibiu maior ADCC que rituximab
15 contra CLL de todos os pacientes (veja, Figura 2A-D e Figura 3). Os percentuais médios de lise máxima por CHIR-12.12 e rituximab foram de $48 \pm 15\%$ e $30 \pm 14\%$, respectivamente. CHIR12.12 foi mais que 10 vezes mais potente que rituximab, como medido por valores de ED_{50}
20 ($13,2 \mu\text{M}$ versus $147,2 \mu\text{M}$, respectivamente, Figura 6).

A maior atividade de ADCC e eficácia de CHIR-12.12 não foi dependente de uma maior densidade de moléculas de CD40 de superfície celular, uma vez que foram números 1,3 a 14 vezes maiores de moléculas CD20 que CD40 na superfície
25 celular (veja, Figura 5 e Figura 6).

Métodos

As células foram pré-incubadas com IgG1 humana a 1 mg/ml em tampão de coloração (PBS contém 1% BSA, 0,1% Na Azida) para bloquear sítios de ligação não específicos.
30 Elas foram incubadas por 30 minutos a 4°C (em gelo). Então

controle de isotipo de IgG1 humana conjugada a FITC, CHIR-12.12 conjugado a FITC, ou rituximab conjugado a FITC foram adicionados a 100, 10, 1, 0,1 µg/ml, e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C (em gelo). As células foram lavadas com tampão de coloração (PBS+1%FBS+0,1% Azida de sódio), e analisadas por FACS Calibur.

A média geométrica de intensidade de fluorescência foi medida por FACS. Moléculas de "Equivalent Soluble Fluorochrome" (MESF) foram então calculadas com base na curva padrão estabelecida por glóbulos FITC calibrados.

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

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

Exemplo 5: Internalização de CHIR-12.12 e Rituximab após

ligação a células de paciente com CLL : FACS e microscopia confocal

Metodologia de microscopia confocal

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

Resultados

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

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

As afinidade de alelos aa158F e aa158V de FcγRIIIa por

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

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

10

Exemplo 7: O efeito de polimorfismo de Fc γ RIIIa sobre ADCC por células efetoras NK

A citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (ADCC) é um mecanismo de ação principal para vários 15 anticorpos monoclonais comercializados e de pesquisa. Rituximab (Rituxan®), comercializado para o tratamento de linfoma folicular não Hodgkin (NHL) e ativo em outras malignidades de células B, tem ADCC como um de seus mecanismos de ação primários. Notavelmente, a atividade 20 clínica de rituximab em NHL mostrou estar correlacionada com o genótipo Fc γ RIIIa. Pacientes com o polimorfismo de Fc γ RIIIa 158aa de V/V ou V/F são mais responsivos a rituximab que aqueles com F/F (por exemplo, veja, Cartron e cols. (2002) Blood 99(3):754-758 ou Dall'Ozzo e cols. 25 (2004) Cancer Res. 64:4664-4669).

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

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

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

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

Muitas modificações e outras modalidades das invenções

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

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

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Aukerman, Sharon Lea
Luqman, Mohammad

<120> Usos de anticorpos anti-CD40

<130> PP028162.0002(319129)

<150> 60/732,730

<151> 2005-11-01

<160> 9

<170> Fast SEQ para Windows versão 4.0

<210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

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

<221> CDS

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

<400> 1

atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc
tct 48

Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val
Ser

1 5 10 15

gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg
acc 96

Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
Thr

20 25 30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag
agc 144

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
Ser

35 40 45

ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag
aag 192

Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln
Lys

50

55

60

cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg
gcc 240

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg
Ala

65

70

75

80

tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat
ttt 288

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
Phe

85

90

95

aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat
tac 336

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
Tyr

100

105

110

tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc
aaa 384

Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr
Lys

115

120

125

gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc
ccg 432

Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
Pro

130

135

140

cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc
ctg 480

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
Leu

145

150

155

160

ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg
gat 528

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
Asp

165

170

175

aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag
gac 576

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
Asp

180

185

190

agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc
aaa 624

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
Lys

195

200

205

gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat
cag 672

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
Gln

210

215

220

ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt
tag 720

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
*

225

230

235

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

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

<400> 3

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctattt taagaggtgt
ccagtgtcag 60
gtgcagtttg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct
gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg
ccaggctcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgagg aaagtaatag
ataccatgca 240
gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagatcac
gctgtatctg 300

```

```

caaatgaaca gcctcagaac tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag
agatgggggt 360
atagcagcac ctgggcctga ctactggggc caggggaaccc tggtcaccgt
ctcctcagca 420
agtaccaagg gcccatccgt cttecccctg gcgcccgcta gcaagagcac
ctctgggggc 480
acagcgcccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac
ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca
gtcctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac
ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaaggtgg acaagagagt
tggtgagagg 720
ccagcacagg gagggagggg gtctgctgga agccaggctc agcgctcctg
cctggacgca 780
tccccggctat gcagtcccag tccagggcag caaggcaggc cccgtctgcc
tcttcacccg 840
gaggcctctg cccgccccac tcatgctcag ggagaggggc ttctggcttt
ttccccaggc 900
tctgggcagg cacaggctag gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag
gggcaggtgc 960
tgggctcaga cctgccaaaga gccatatccg ggaggaccct gccctgacc
taagcccacc 1020
ccaaaggcca aactctccac tccctcagct cggacacctt ctctcctccc
agattccagt 1080
aactcccaat cttctctctg cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca
catgccacc 1140
gtgcccaggt aagccagccc aggccctgcc ctccagctca aggcgggaca
ggtgccctag 1200
agtagcctgc atccagggac aggccccagc cgggtgctga cacgtccacc
tccatctctt 1260
cctcagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt ctteccccca
aaacccaagg 1320
acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac
gtgagccacg 1380
aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat
aatgccaaga 1440
caaagccgcg ggaggagcag tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc
ctcaccgtcc 1500
tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac
aaagccctcc 1560
cagcccccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaaggtgg gaccctgggg
gtgcgagggc 1620
cacatggaca gaggccggct cggcccaccc tctgccctga gagtgaccgc
tgtaccaacc 1680
tctgtcccta cagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc
atcccgggag 1740
gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttgggtca aaggcttcta
tcccagcgac 1800

```

atcgccgtgg agtgggagag caatgggag cgggagaaca actacaagac
 cagcctccc 1860
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga
 caagagcagg 1920
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcattgctcc gtgatgcatg aggctctgca
 caaccactac 1980
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga
 2016

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

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

<400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg
 Gly

1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
 Gln

20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 Phe

35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 Leu

50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His
 Ala

65 70 75

80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 Ile

85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala
 Val

100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp
 Tyr

115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 Gly

130 135 140
 Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 Gly

145 150 155

160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 Phe
 180 185 190
 Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 Val
 195 200 205
 Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 Val
 210 215 220
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 Lys
 225 230 235
 240
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 Thr
 260 265 270
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 Val
 275 280 285
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 Val
 290 295 300
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 Ser
 305 310 315
 320
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 Leu
 325 330 335
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 Ala
 340 345 350
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 Pro
 355 360 365
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 Gln
 370 375 380
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 Ala
 385 390 395
 400
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 Leu
 420 425 430
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 Ser
 435 440 445
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 Ser
 450 455 460
 Leu Ser Pro Gly Lys
 465

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

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

<400> 5
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg
 Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val
 Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His
 Ala
 65 70 75
 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 Ile
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala
 Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp
 Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 Gly

Pro Gly 145 160 Thr Val	Ser Ala 195 210 Asn His 225 240 Ser Cys 255 270 Thr Tyr 305 320 Asn Gly 335 350	Val Ala 180 200 Pro Ser 215 230 Asp Lys 245 260 His Glu 275 290 Arg Val 310 325 Lys Glu 340 355 Ile Thr 370	Phe Leu 165 185 Ser Ser 205 225 Thr His 240 260 Asp Pro 275 295 Val Val 315 330 Tyr Thr 345 360	Pro Gly 150 175 Asn Ser 190 210 Thr Val 225 240 Ser Val 255 270 Arg Glu 285 300 Lys Cys 315 335 Ile Thr 350 375	Leu Cys 170 185 Gly Leu 200 225 Thr Val 235 250 Phe Leu 265 280 Lys Val 295 310 Ser Arg 325 340 Pro Thr 360 380	Ala Val 155 170 Ser Gly 185 205 Thr Gln 220 235 Pro Cys 250 265 Phe Asn 280 295 Val Ser 315 330 Ala Lys 345 360	Pro Ser 140 155 Lys Tyr 170 185 Ser Leu 205 220 Arg Val 235 250 Trp Tyr 280 295 Glu Gln 315 330 Met Thr 345 360	Ser Thr 130 145 Thr Val 160 175 Ser Gly 180 195 Thr Tyr 220 235 Val Val 250 265 Gln Pro 280 295 Arg Asp 315 330	130 145 160 175 180 195 200 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380
-------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---

[illegible]

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

```
<220>
<221> Características mis.
<222> (0)...(0)
<223> Sequência codificadora para isoforma curta de CD40
humano
```

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

```
<400> 6
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg
acc      48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu
Thr
      1              5              10              15
```

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac
cta 96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr
Leu
20 25 30

ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg
gtg 144
Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu
Val
35 40 45

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt
 gaa 192
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly
 Glu

50

55

60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag
 cac 240
 Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln
 His
 65 70 75
 80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc
 acc 288
 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly
 Thr

85

90

95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt
 acg 336
 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys
 Thr

100

105

110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc
 ggc 384
 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro
 Gly

115

120

125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc
 gag 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> 7

<211> 203

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu
 Thr

1

5

10

15

Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr
 Leu

20

25

30

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu
 Val

35

40

45

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly
 Glu

50

55

60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln
 His

65

70

75

80

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly
 Thr

85

90

95

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys
 Thr

100

105

110

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro
 Gly

115

120

125

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys
 Glu

130

135

140

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu
 Lys

145

150

155

160

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

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

<220>
 <221> Características mis.
 <222> (0)...(0)
 <223> Seqüência codificadora para isoforma longa de CD40 humano

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

<400> 8
 atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg
 acc 48
 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu
 Thr
 1 5 10 15
 gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac
 cta 96
 Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr
 Leu
 20 25 30
 ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg
 gtg 144
 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu
 Val
 35 40 45
 agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt
 gaa 192
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly
 Glu
 50 55 60
 agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag
 cac 240

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln
 His
 65 70 75
 80
 aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc
 acc 288
 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly
 Thr
 85 90 95
 tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt
 acg 336
 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys
 Thr
 100 105 110
 agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc
 ggc 384
 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro
 Gly
 115 120 125
 ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc
 gag 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 agc tgt gag acc aaa gac ctg gtt gtg caa
 cag 528
 Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln
 Gln
 165 170 175
 gca ggc aca aac aag act gat gtt gtc tgt ggt ccc cag gat cgg
 ctg 576
 Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg
 Leu
 180 185 190
 aga gcc ctg gtg gtg atc ccc atc atc ttc ggg atc ctg ttt gcc
 atc 624
 Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala
 Ile

195	200	205
ctc ttg gtg ctg gtc ttt atc aaa aag gtg gcc aag aag cca acc		
aat 672		
Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr		
Asn		
210	215	220
aag gcc ccc cac ccc aag cag gaa ccc cag gag atc aat ttt ccc		
gac 720		
Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro		
Asp		
225	230	235
240		
gat ctt cct ggc tcc aac act gct gct cca gtg cag gag act tta		
cat 768		
Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu		
His		
	245	250
		255
gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc		
tca 816		
Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile		
Ser		
	260	265
		270
gtg cag gag aga cag tga		
834		
Val Gln Glu Arg Gln *		
275		

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

<400> 9
 Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu
 Thr
 1 5 10 15
 Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr
 Leu
 20 25 30
 Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu
 Val
 35 40 45
 Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly
 Glu
 50 55 60

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln
 His
 65 70 75
 80
 Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly
 Thr
 85 90 95
 Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys
 Thr
 100 105 110
 Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro
 Gly
 115 120 125
 Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys
 Glu
 130 135 140
 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu
 Lys
 145 150 155
 160
 Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln
 Gln
 165 170 175
 Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg
 Leu
 180 185 190
 Arg Ala Leu Val Val Ile Pro Ile Ile Phe Gly Ile Leu Phe Ala
 Ile
 195 200 205
 Leu Leu Val Leu Val Phe Ile Lys Lys Val Ala Lys Lys Pro Thr
 Asn
 210 215 220
 Lys Ala Pro His Pro Lys Gln Glu Pro Gln Glu Ile Asn Phe Pro
 Asp
 225 230 235
 240
 Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu
 His
 245 250 255
 Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile
 Ser
 260 265 270
 Val Gln Glu Arg Gln
 275

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, caracterizado pelo fato que o
5 referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), o método compreendendo a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40.

10 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é um câncer de linhagem de células B.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido câncer de
15 linhagem de células B é selecionado do grupo que consiste em leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia pró-linfocítica (PLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), leucemia de célula pilosa, doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de
20 Waldenstrom, doença de cadeia pesada, e os linfomas como linfoma linfocítico pequeno difuso, folicular, DLBCL, linfoma de tecido linfóide associado à mucosa, linfoma de célula B monocitóide, linfoma esplênico, granulomatose linfomatóide, linfomatose intravascular, linfoma
25 imunoblástico e linfoma relacionado à AIDS.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é uma malignidade hematológica de célula não B.

30 5. Método, de acordo com a reivindicação 4,

caracterizado pelo fato de que a referida malignidade hematológica de célula não B é leucemia mielocítica aguda.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou
5 condição pré-maligna é um tumor sólido.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o referido tumor sólido é selecionado do grupo que consiste em ovário, pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de célula não pequena do
10 carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de célula grande e câncer de pulmão de célula pequena), mama, cólon, rim (incluindo, por exemplo, carcinomas de células renais), bexiga, fígado (incluindo, por exemplo, carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, próstata,
15 nasofaríngeo, e tireóide (por exemplo, carcinoma papilar da tireóide), cânceres cutâneos como melanoma, e sarcomas (incluindo, por exemplo, osteossarcomas e sarcomas de Ewing).

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou
20 condição pré-maligna é um câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam CD20.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou
25 condição pré-maligna é uma malignidade de célula B.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é um câncer ou condição pré-maligna associada com células que expressam tanto CD40 quanto CD20.

30 11. Método, de acordo com a reivindicação 10,

caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é uma malignidade de célula B.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou 11,
5 caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é administrado por uma via de administração parenteral.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12,
10 caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é administrado por via intravenosa ou subcutânea.

14. Uso de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40
15 caracterizado para a manufatura de um medicamento para o tratamento de um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 em um paciente humano heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F).

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14,
20 caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é um câncer de linhagem de célula B.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15,
25 caracterizado pelo fato de que o referido câncer de linhagem de células B é selecionado do grupo que consiste em leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia pró-linfocítica (PLL), leucemia linfocítica pequena (SLL), leucemia de célula pilosa, doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, e os linfomas como linfoma linfocítico pequeno difuso, folicular, DLBCL,
30 linfoma de tecido linfóide associado à mucosa, linfoma de

célula B monocitóide, linfoma esplênico, granulomatose linfomatóide, linfomatose intravascular, linfoma imunoblástico e linfoma relacionado à AIDS.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 14,
5 caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é uma malignidade hematológica de célula não B.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 17,
10 caracterizado pelo fato de que a referida malignidade hematológica de célula não B é leucemia mielocítica aguda.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 14,
caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é um tumor sólido.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 19,
15 caracterizado pelo fato de que o referido tumor sólido é selecionado do grupo que consiste em ovário, pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de célula não pequena do carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de célula grande e câncer de pulmão de célula pequena),
20 mama, cólon, rim (incluindo, por exemplo, carcinomas de células renais), bexiga, fígado (incluindo, por exemplo, carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, próstata, nasofaríngeo, e tireóide (por exemplo, carcinoma papilar da tireóide), cânceres cutâneos como melanoma, e sarcomas
25 (incluindo, por exemplo, osteossarcomas e sarcomas de Ewing).

21. Uso, de acordo com a reivindicação 14,
caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é um câncer ou condição pré-maligna
30 associada com células que expressam CD20.

22. Uso, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é uma malignidade de célula B.

23. Uso, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é um câncer ou condição pré-maligna que é associada com células que expressam tanto CD40 quanto CD20.

24. Uso, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o referido câncer ou condição pré-maligna é uma malignidade de célula B.

25. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ou 24, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é administrado por uma via de administração parenteral.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido medicamento é formulado para administração por via intravenosa ou subcutânea.

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

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano tem um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40.

29. Uso de uma quantidade eficaz de um anticorpo

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

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

10 31. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 humano compreende uma região constante de cadeia pesada de IgG1 humana.

15 32. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que a referida região constante de cadeia pesada de IgG1 humana compreende a seqüência de aminoácidos apresentada em Id. de Seq. N°:4 ou Id. de Seq. N°:5.

20 33. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ou 32, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é livre de significante atividade agonista.

25 34. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 ou 33, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é um antagonista de
30 sinalização de CD40-CD40L em células que expressão CD40.

35. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é selecionada do grupo que consiste em:

a) o anticorpo monoclonal CHIR-12.12;

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

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

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

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

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

30 g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo

que compreende resíduos 82-89 da sequência de CD40 humano mostrada em Id. de Seq. N°:7 ou Id. de Seq. N°:9;

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

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

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

36. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é o anticorpo monoclonal CHIR-12.12.

37. Método ou uso, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o referido fragmento de ligação a antígeno é selecionado do grupo que consiste em um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento Fv e um fragmento Fv de cadeia única.

38. Método para identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®), caracterizado pelo fato que compreende:

a) a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40; e

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

em que o referido câncer ou condição pré-maligna é tratável com um anticorpo anti-CD40 se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa158F (genótipo V/F ou F/F).

39. Método para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem câncer ou condição pré-maligna que é refratária ao tratamento com rituximab (Rituxan®), caracterizado pelo fato que compreende:

a) a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 e que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®); e

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

em que se o referido paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F), um anticorpo anti-CD40 é selecionado para o tratamento do referido câncer ou condição pré-maligna.

40. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é refratário a uma terapia com um agente anticâncer.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é refratário a uma terapia com um anticorpo monoclonal anti-

CD20.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é resistente a terapia com um anticorpo monoclonal anti-CD20.

5 43. Método, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de que o referido paciente humano é não responsivo a terapia com um anticorpo monoclonal anti-CD20.

10 44. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41, 42 ou 43, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD20 é rituximab (Rituxin®).

15 45. Kit para identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna tratável com um anticorpo anti-CD40, caracterizado pelo fato que compreende reagentes para a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

20 46. Kit para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que é associada com células que expressam CD40, caracterizado pelo fato que compreende reagentes para determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

25 47. Kit de acordo com a reivindicação 45 ou 46, caracterizado por incluir um micro-arranjo que compreende pelo menos um marcador de 10 ou mais nucleotídeos de comprimento e de uma sequência adequada para a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

30 48. Kit, de acordo com a reivindicação 45 ou 46, caracterizado pelo fato de compreender oligonucleotídeos

adequados para uso como iniciadores em amplificação catalisada por polimerase da região genômica que codifica aminoácido 158 de FcγRIIIa.

49. Kit, de acordo com a reivindicação 45 ou 46,
5 caracterizado por compreender uma ou mais enzimas de restrição adequadas para a determinação do genótipo FcγRIIIa-158 de um paciente humano.

50. Método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a
10 células que expressam CD40, o método caracterizado pelo fato que compreende a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo que o anticorpo anti-CD40 não seja significativamente
15 internalizado por células que expressam CD40 após a administração.

51. Método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, o método caracterizado pelo
20 fato que compreende a administração ao referido paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40, de modo que o anticorpo anti-CD40 permaneça substancialmente uniformemente distribuído na superfície de células que
25 expressam CD40 após administração.

52. Método para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40, o método caracterizado pelo
fato que compreende a administração ao referido paciente
30 humano um anticorpo anti-CD40, de modo que uma quantidade

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

5 53. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que o referido método ou uso
10 resulta em citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam CD40 por células natural killer (NK) que expressam FcγRIIIa de um paciente humano.

 54. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,
15 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é mais potente que rituximab (Rituxin®) em um ensaio de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC),
20 em que o ensaio compreende a incubação de células que expressam CD40 e células que expressam CD20 com células natural killer (NK) isoladas humanas na presença do anticorpo relevante.

 55. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das
25 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 é mais potente que rituximab (Rituxan®) em um modelo
30 de tumor de xenoenxerto de camundongo.

56. Método, de acordo com a reivindicação 55, caracterizado pelo fato de que o referido modelo de tumor de xenoenxerto de camundongo usa a linha de células de linfoma humano Daudi de uma linha de células de mieloma.

5 57. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-
10 CD40 se liga a CD40 humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 10^{-6} M a pelo menos cerca de 10^{-12} M.

58. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28,
15 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 se liga a Fc γ RIIIa-158V humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 0,5 μ M.

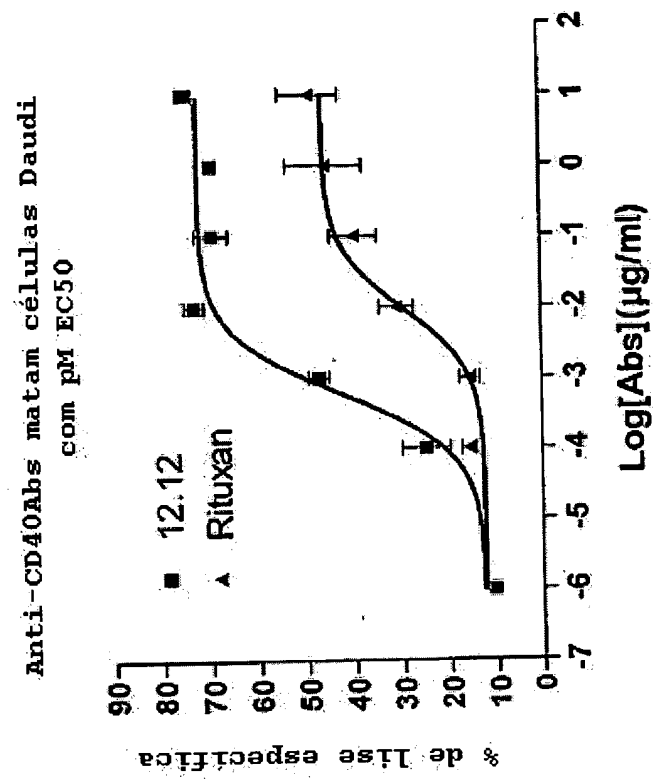
59. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das
20 reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-CD40 se liga a Fc γ RIIIa-158F humano com uma afinidade (K_D)
25 de pelo menos cerca de 12 μ M.

60. Método ou uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 50, 51 ou 52,
30 caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo anti-

CD40 se liga a FcγRIIIa-158V humano com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 0,5 μM, e se liga a FcγRIIIa-158F humano com uma afinidade (KD) de pelo menos cerca de 12 μM.

Figura 1A

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

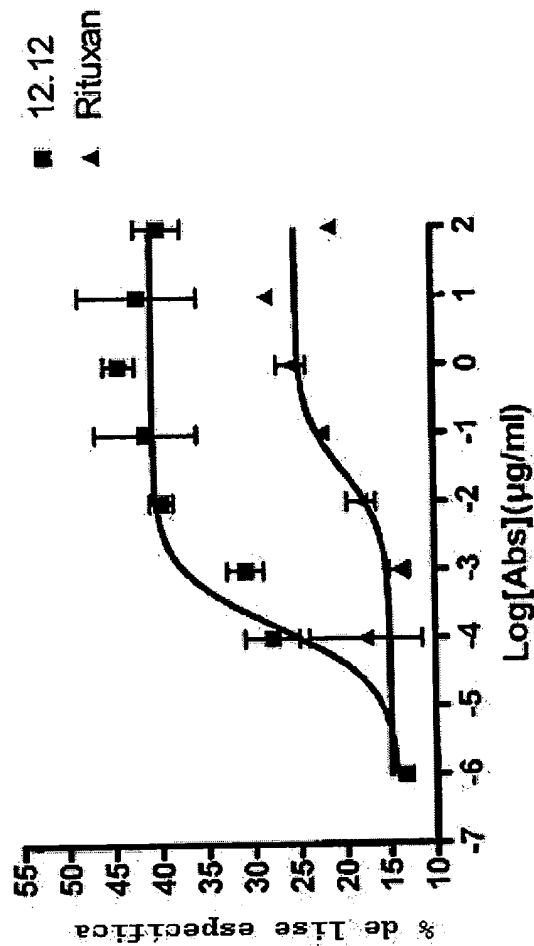


ED50 de 12.12: 4.07pM; Rituxan: 66.93pM

Figura 1B

ADCC-036 (linha de células de linfoma Namalwa)

Atividade de morte por ADCC de anti-Cd40Abs em células Namalwa com pM EC50



EC50 de 12.12: 1.01pM; Rituxan: 189.72pM

Figura 1C

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

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

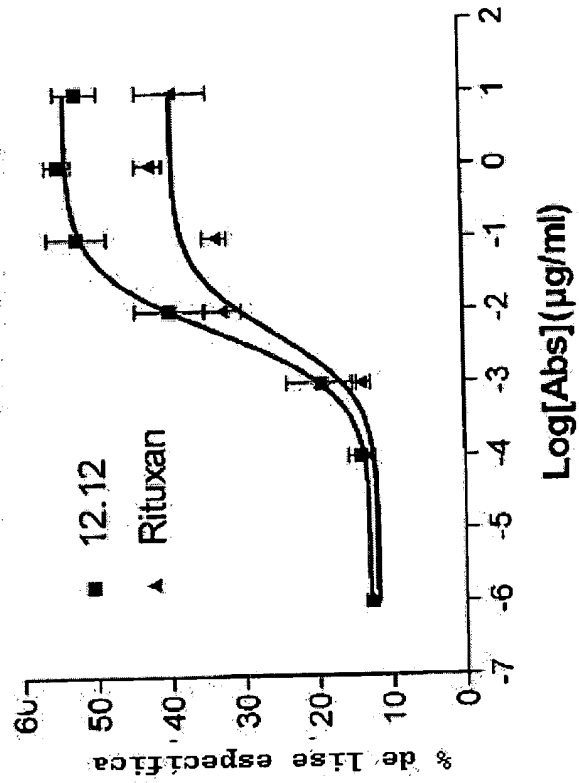
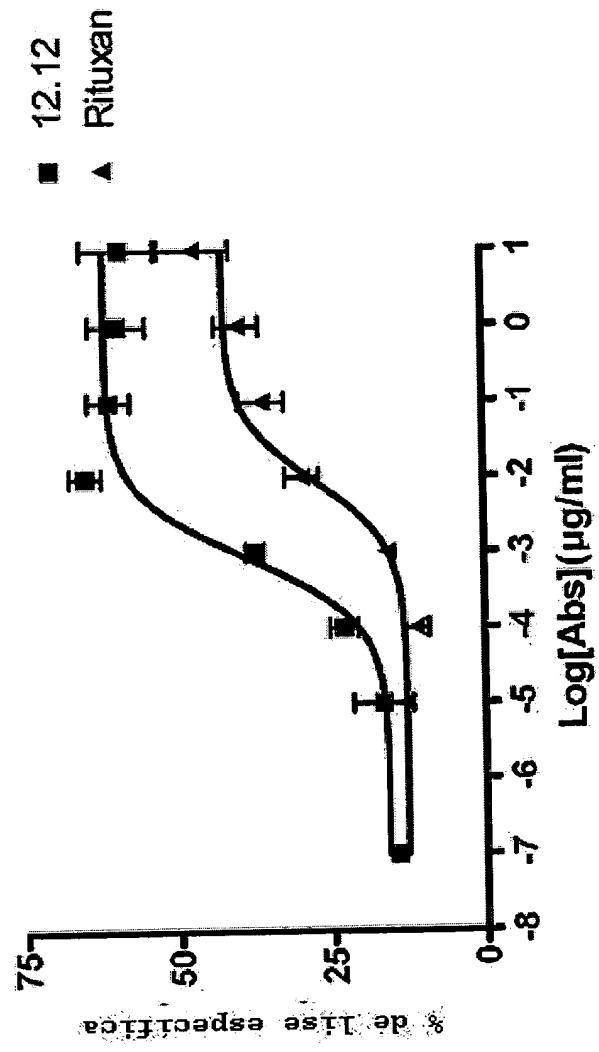


Figura 1D

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

Atividade de morte por ADCC em células IM-9 com pM EC50

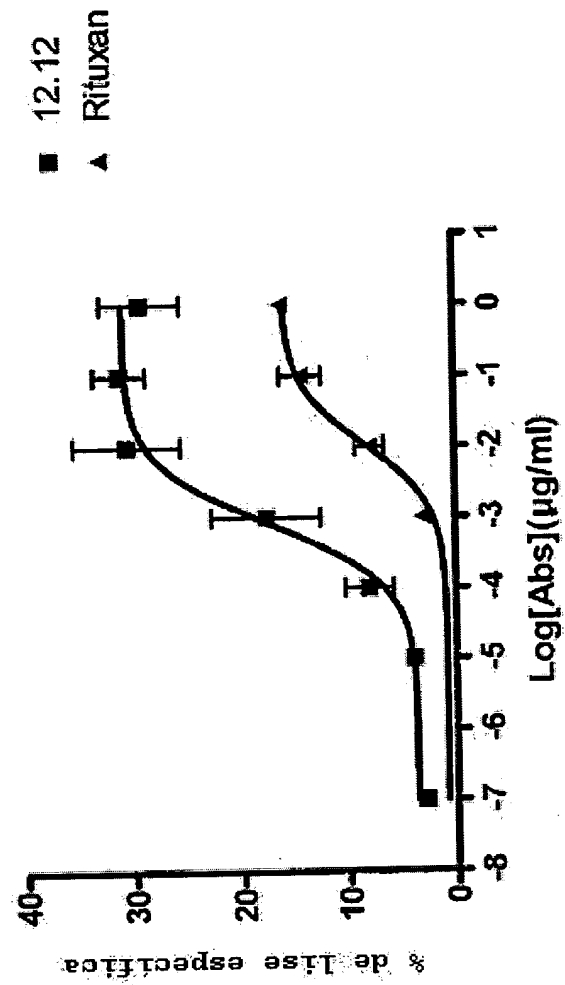


EC50 de 12.12: 5.92pM; Rituxan: 61.02pM

Figura 1E

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

Atividade de ADCC em células EHEB com pM EC50



EC50 de 12.12: 5.56pM; Rituxan: 76.43pM

Figura 1F

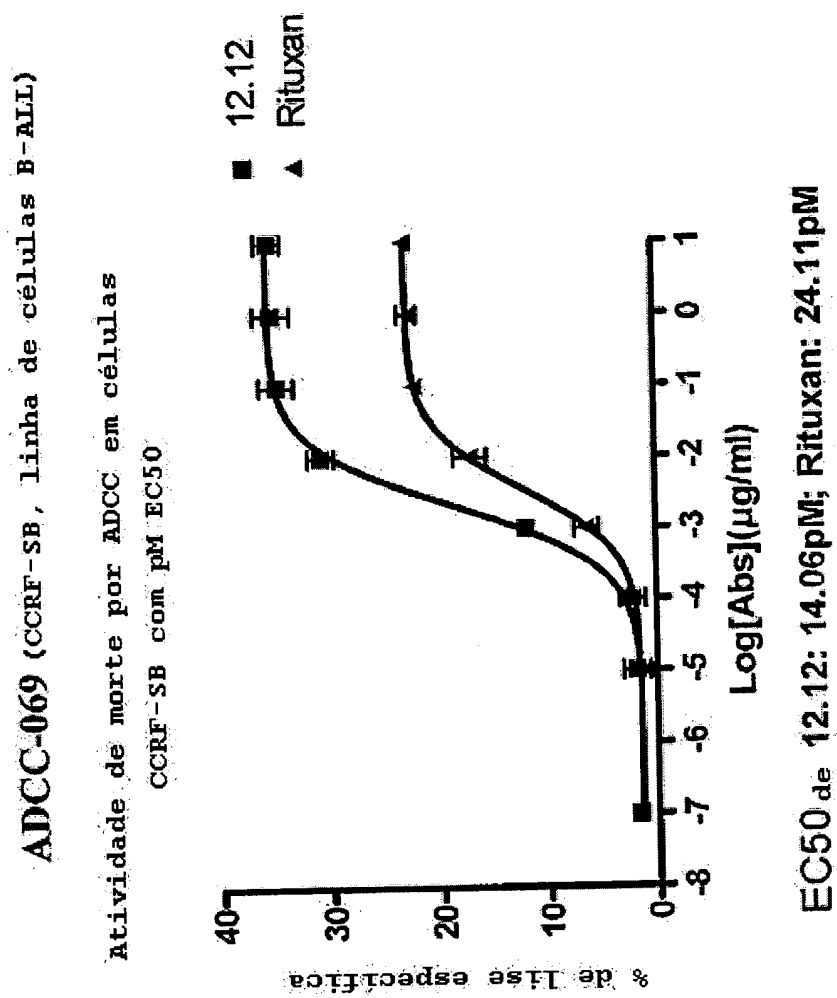


Figura 2A: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de pacientes com CLL

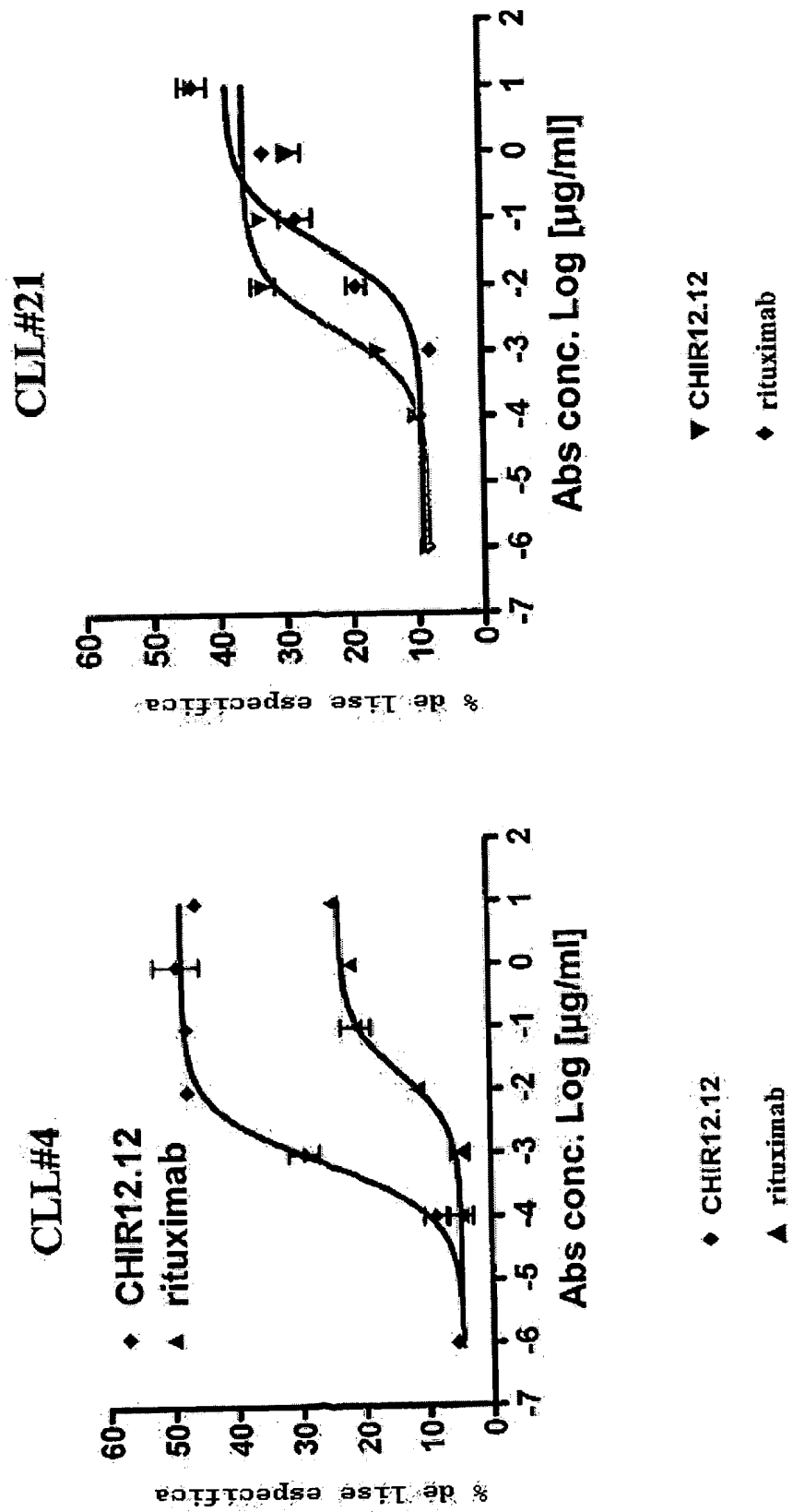


Figura 2B: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de paciente com CLL

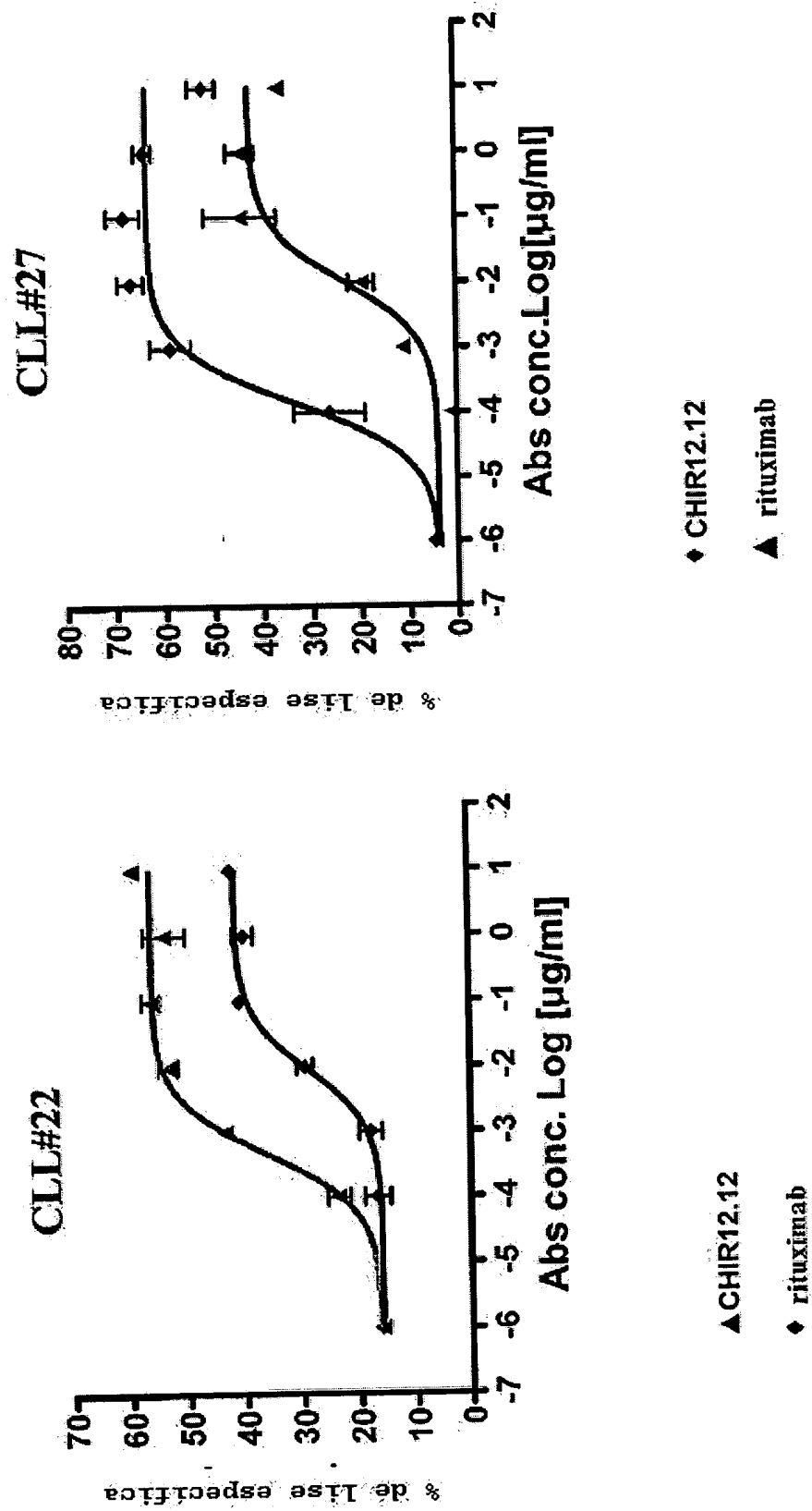
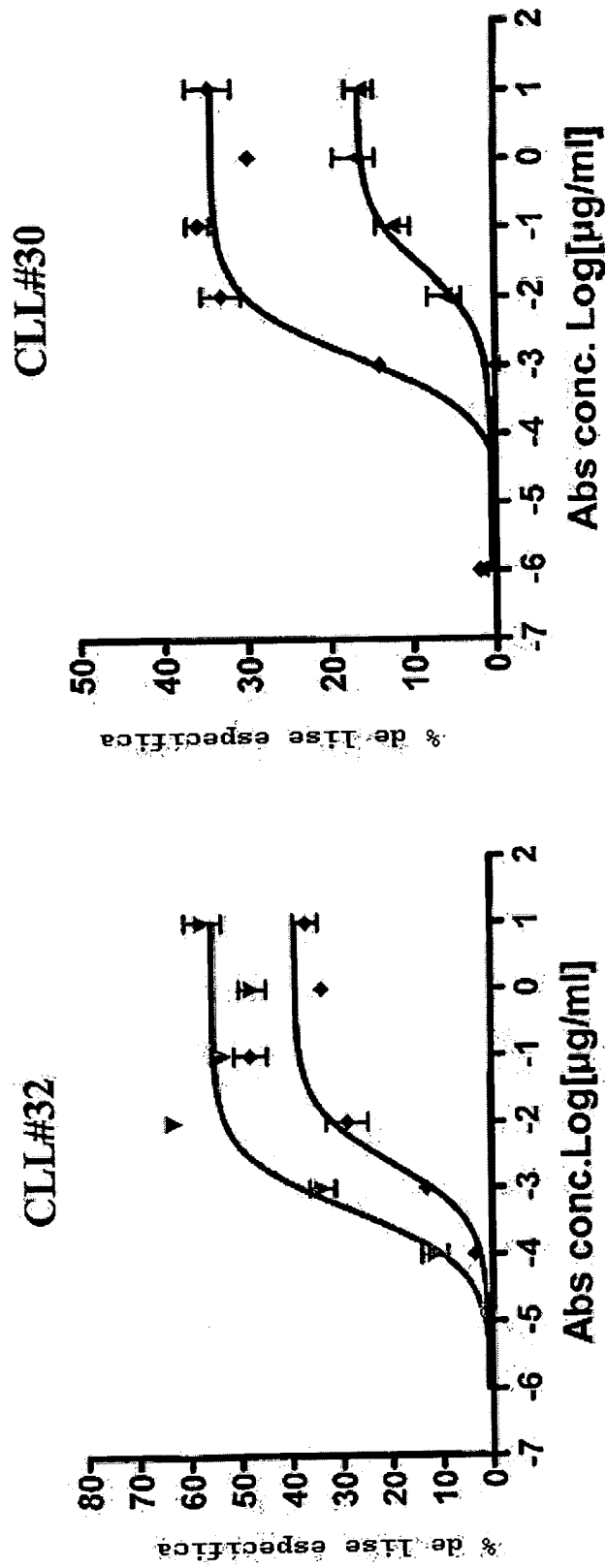


Figura 2C: CHIR-12.12 medeia maior ADCC que rituximab contra células de paciente com CLL



◆ CHIR12.12

▲ rituximab

▼ CHIR12.12

◆ rituximab

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

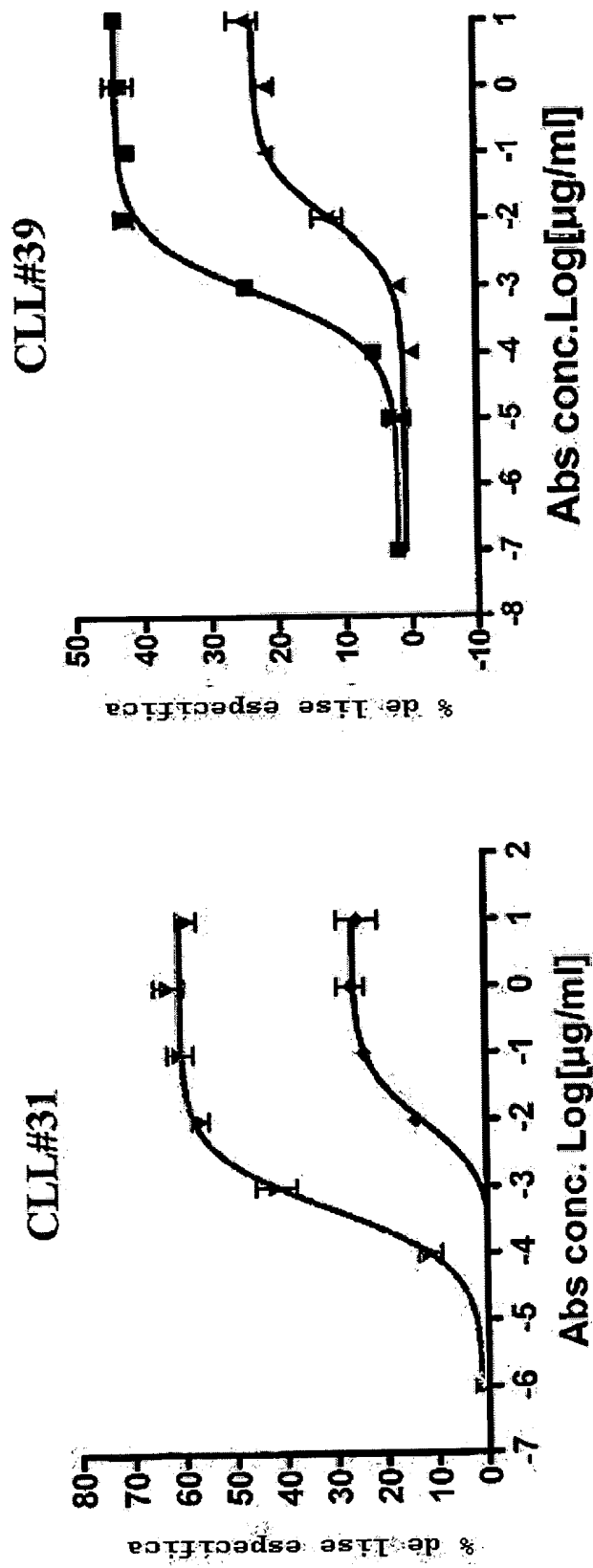


Figura 3: ADCC comparativo de CHIR-12.12 e rituximab contra células de pacientes com CLL (n=9) por células NK humanas de doadores múltiplos

Abs conc.(µg/ml)	Fração de lise mediada por rituximab comparada a CHIR-12.12	CHIR-12.12 EC50(pM)	Rituximab EC50(pM)
		13.25 ± 16.73	147.22 ± 135.6
	10		
	1		
	0.1		
	0.01		
	0.001		
	0.0001		
0.00001	-0.45 ± 0.49		

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

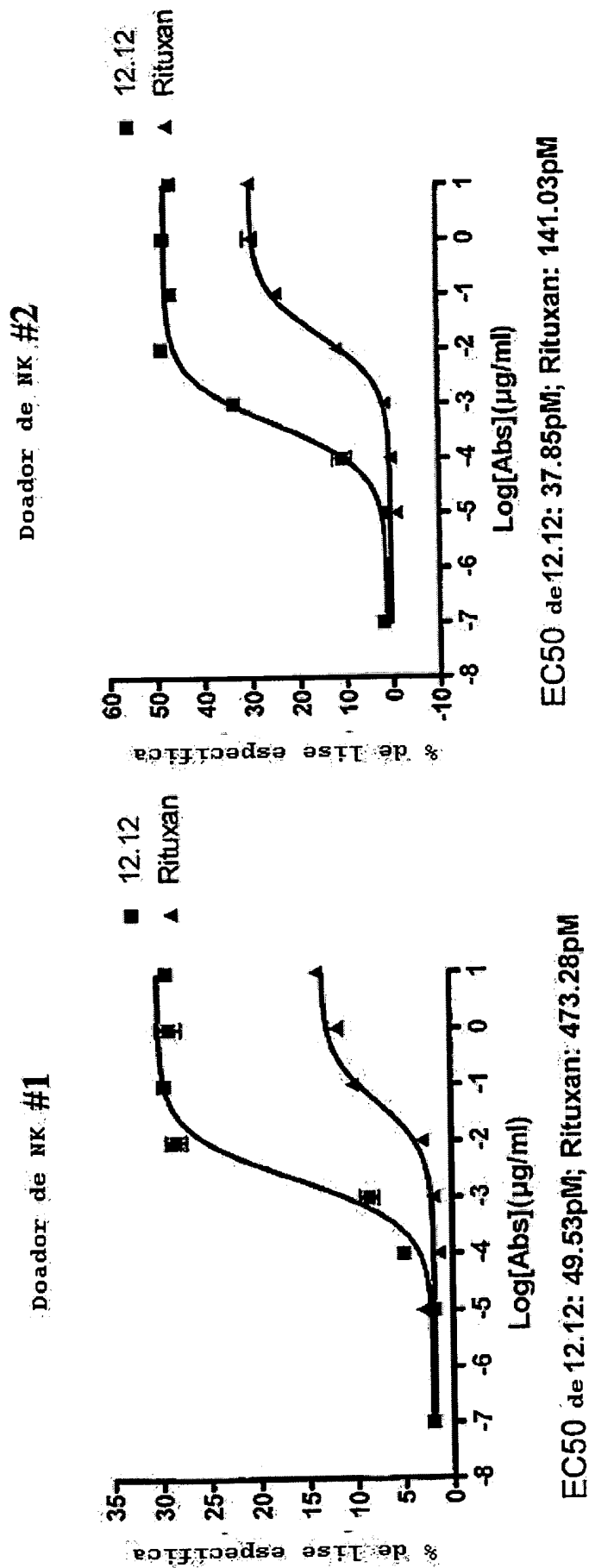


Figura 5: Quantificação de moléculas de CD40 e CD20 expressas em células de pacientes com CLL e células b normais

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

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

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

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

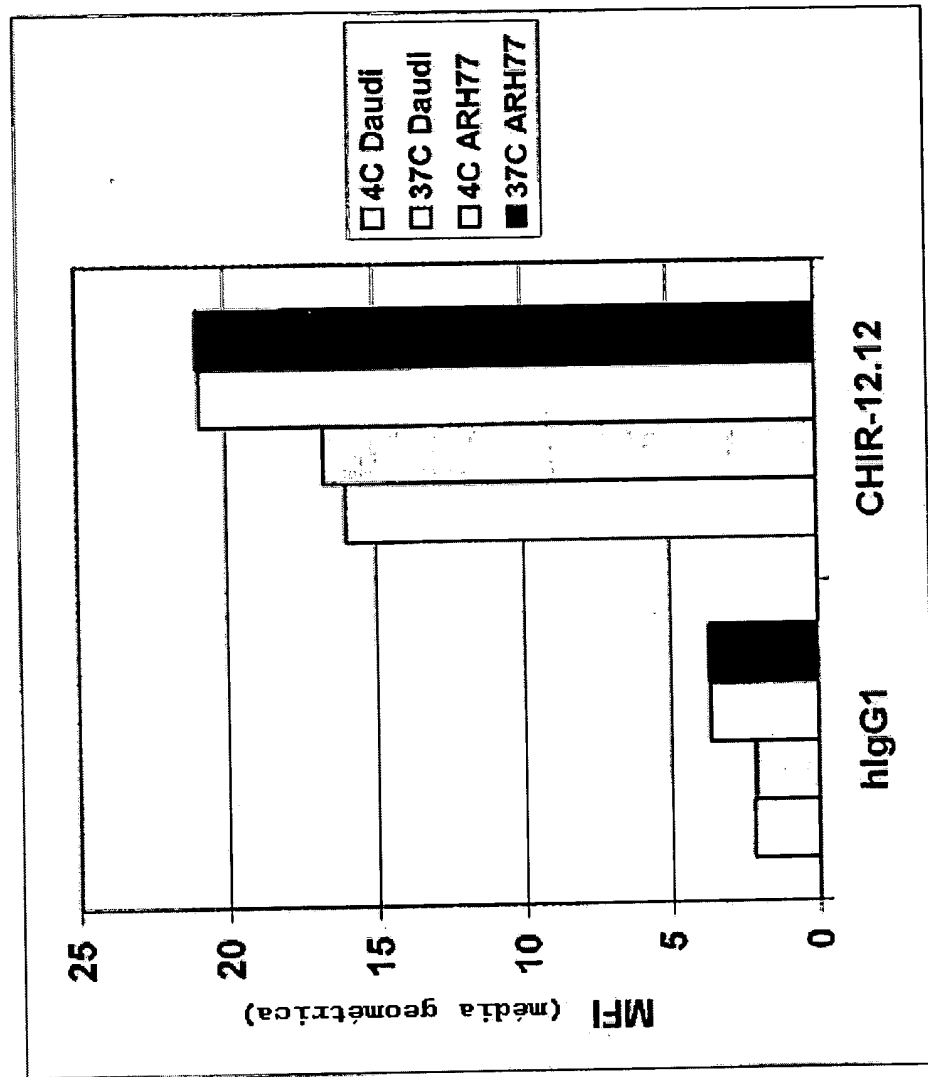
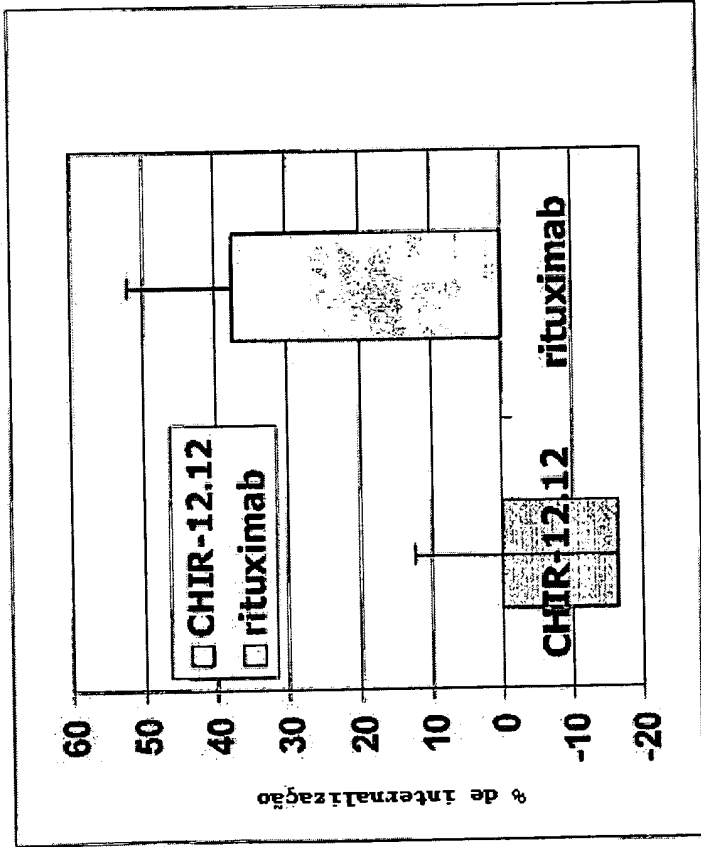


Figura 8: Percentagem de internalização de CHIR-12.12 e rituximab em células de pacientes com CLL (n=8):FAC



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

GMF: média geométrica de intensidade de fluorescência

* % negativo de internalização indica maior ligação de CHIR-12.12 a 37°C comparado a 4°C

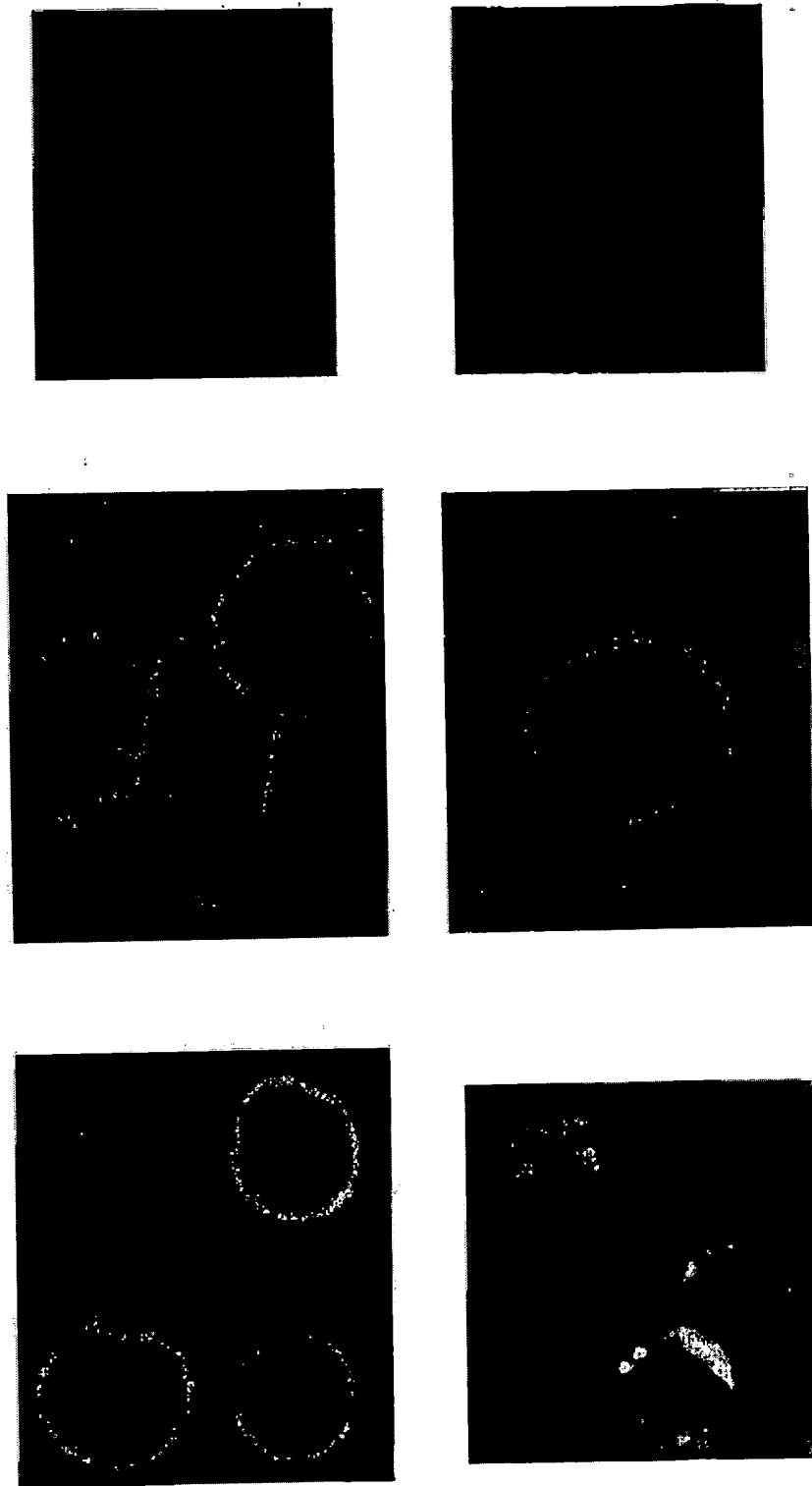
CLL #	CHIR-12.12	rituximab
4	-12	53
21	18	23
22	-9	38
27	-14	20
32	-14	27
30	-43	32
31	-71	49
33	13	59
SD médio	-16.5 *	37.63
	28.84	14.60

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

IgG1-FITC

12.12-FITC

Rituximab-FITC



4°C

37°C

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

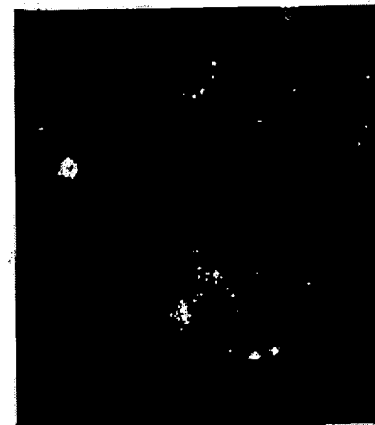
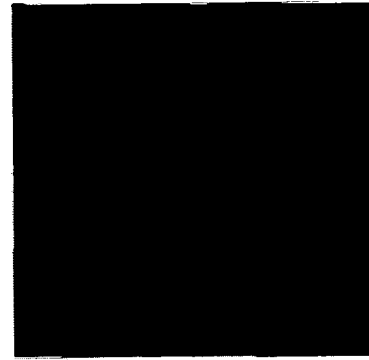
IgG1- Alexa488

12.12- Alexa488

Rituximab-Alexa488



4°C



37°C

Figura 11: Relação entre atividade de ADCC e internalização

Paciente com CLL #	% de lise máxima			% de Internalização	
	CHIR-12.12	Rituximab	Diferença entre CHIR-12.12 e Rituximab	CHIR-12.12	Rituximab
4	46.35	20.15	26.2	No	53
21	32.9	32.8	0.1	18	23
22	46.65	31.08	15.57	No	38
27	79.87	56.04	23.83	No	20
32	56.92	49.97	6.95	No	27
30	37.6	21.33	16.27	No	32
31	63.4	27.27	36.13	No	49
33(1)	27.71	12.33	15.38		
33(2)	48.57	28.63	19.94	13	59
39	44.18	21.13	23.05	N/A	N/A

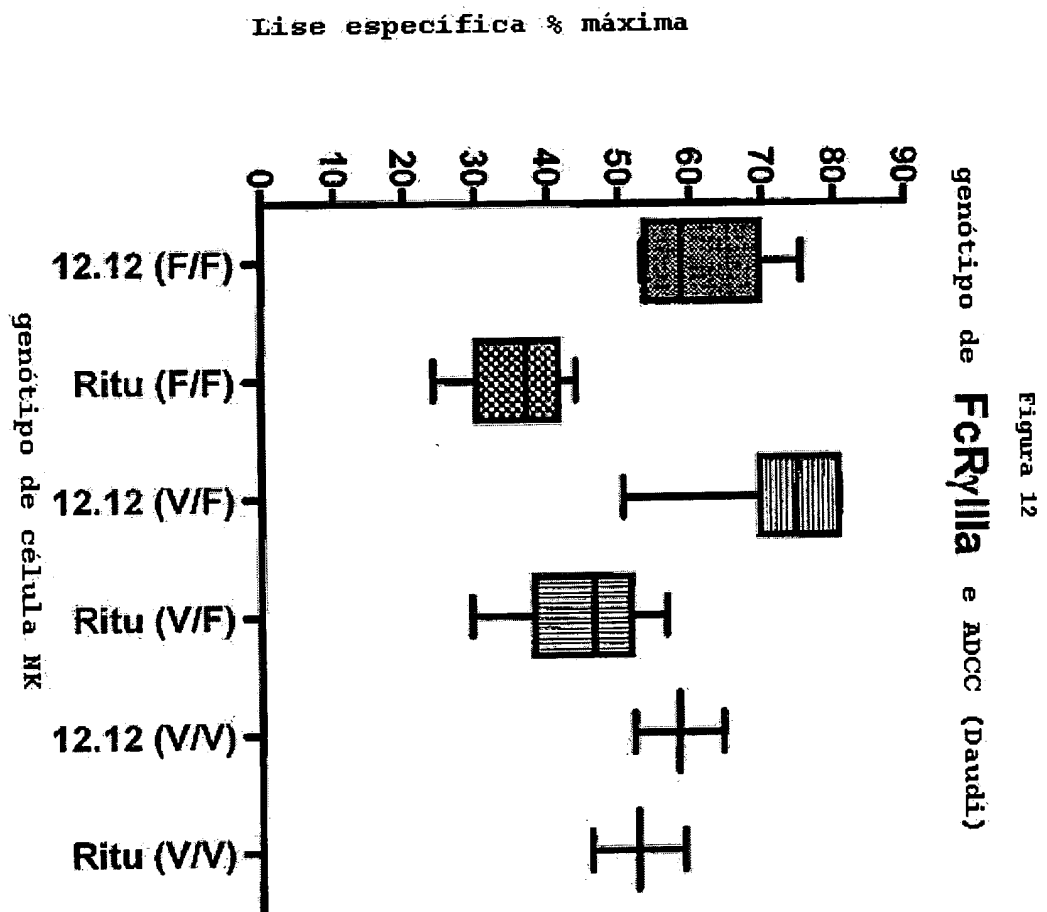


Figura 13
genótipo de **FcγIIIa** e ADCC (Daudi.)

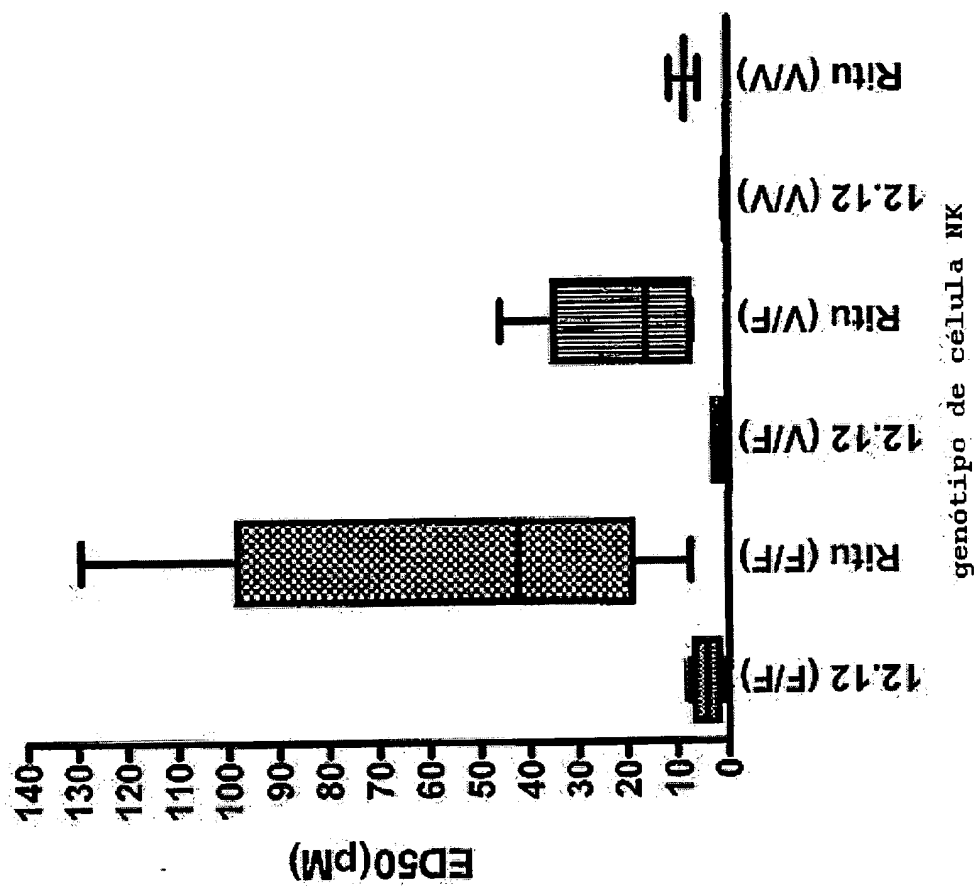


Figura 14: ADCC comparativa de CHIR-12.12 e rituximab contra células de paciente com CLL (n=9) por células NK humanas de doadores múltiplos com genótipo de FcγIIIa variante

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

USO DE ANTICORPOS ANTI-CD40

Métodos para o tratamento de um paciente humano para um câncer ou condição pré-maligna que está associada a células que expressam CD40 são fornecidos, em que o

5 paciente humano é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Também são fornecidos métodos de inibição da produção de anticorpo por células B em um paciente humano que é heterozigótico ou homozigótico para FcγRIIIa-158F (genótipo V/F ou F/F). Os métodos

10 compreendendo a administração ao paciente humano de uma quantidade terapêuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo anti-CD40. Métodos e kits para a identificação de um paciente humano com um câncer ou condição pré-maligna que é tratável com um anticorpo anti-CD40 e que é

15 refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), bem como métodos e kits para a seleção de uma terapia com anticorpo para o tratamento de um paciente humano que tem um câncer ou condição pré-maligna que é refratário ao tratamento com rituximab (Rituxan®), também são fornecidos. Os métodos da

20 presente invenção têm uso no tratamento de cânceres e condições pré-malignas que são associadas a células que expressam CD40. Esses métodos são particularmente vantajosos com relação a cânceres e condições pré-malignas que são associadas a células que expressam tanto CD40

25 quanto CD20, uma vez que os métodos permitem o tratamento de pacientes que têm câncer ou condição pré-maligna que é refratário à terapia com outros agentes oncoterapêuticos como anticorpos anti-CD20.