

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

(22) Data de pedido: 2004.11.04	(73) Titular(es): NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC. 4560 HORTON STREET EMERYVILLE, CA 94608 US
(30) Prioridade(s): 2003.11.04 US 517337 2003.11.26 US 525579 2004.04.27 US 565710	(72) Inventor(es): LI LONG US ASHA YABANNAVAR US ISABEL ZAROR US XIAOFENG LU US SANG HOON LEE US
(43) Data de publicação do pedido: 2010.02.03	(74) Mandatário: LUÍSA MARIA FERREIRA GUERREIRO PRACETA FERNANDO NAMORA, Nº 7, 3º ESQ. 2820-598 CHARNECA DA CAPARICA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2013.08.14 227/2013	

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS ANTI-CD40**

(57) Resumo:

SÃO FORNECIDOS MÉTODOS DE TERAPIA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS MEDIADAS PELA ESTIMULAÇÃO DA SINALIZAÇÃO DE CD40 EM CÉLULAS QUE EXPRESSAM CD40. OS MÉTODOS COMPREENDEM A ADMINISTRAÇÃO DE UMA QUANTIDADE TERAPEUTICAMENTE EFICAZ DE UM ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-CD40 OU O FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DO MESMO A UM DOENTE NECESSITADO DA MESMA. O ANTICORPO ANTAGONISTA ANTI-CD40 OU O FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DO MESMO ESTÁ ISENTO DE ATIVIDADE AGONISTA SIGNIFICATIVA, MAS EXIBE ATIVIDADE ANTAGONISTA QUANDO O ANTICORPO SE LIGA A UM ANTIGÉNIO CD40 NUMA CÉLULA QUE EXPRESSA CD40 HUMANO. A ATIVIDADE ANTAGONISTA DO ANTICORPO ANTI-CD40 OU O FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTIGÉNIO DO MESMO INIBE BENEFICAMENTE A PROLIFERAÇÃO E/OU DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS HUMANAS QUE EXPRESSAM CD40, TAIS COMO AS CÉLULAS B.

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS ANTI-CD40

São fornecidos métodos de terapia para o tratamento de doenças mediadas pela estimulação da sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Os métodos compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a um doente necessitado da mesma. O anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo está isento de atividade agonista significativa, mas exibe atividade antagonista quando o anticorpo se liga a um antigénio CD40 numa célula que expressa CD40 humano. A atividade antagonista do anticorpo anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo inibe benéficamente a proliferação e/ou diferenciação de células humanas que expressam CD40, tais como as células B.

DESCRIÇÃO

UTILIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS ANTI-CD40

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a anticorpos humanos capazes de se ligarem a CD40, os métodos de utilização dos anticorpos, e métodos para o tratamento de doenças mediadas pela estimulação da sinalização de CD40 em células que expressam CD40.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As células B desempenham um papel importante durante a resposta imune normal *in vivo*. Um antígeno estranho irá ligar-se a imunoglobulinas da superfície de células B específicas, desencadeando uma cadeia de eventos que incluem a endocitose, processamento, apresentação dos péptidos processados nas moléculas de MHC de classe II, e uma sobre-regulação do antígeno B7 à superfície da célula B. Em seguida, uma célula T específica liga-se à célula B através do reconhecimento do receptor de células T (TCR), do antígeno processado apresentado na molécula MHC de classe II. A estimulação através do TCR ativa a célula T e inicia a produção de citocinas de células T. Um segundo sinal que ativa ainda a célula T é uma interação entre o antígeno CD28 nas células T e o antígeno B7 nas células B. Quando os sinais acima referidos são recebidos, o ligando de CD40 (CD40L ou CD154), que não é expresso em células T humanas restantes, é sobre-regulado na superfície das células T. A ligação do ligando de CD40 ao antígeno CD40 na superfície das células B estimula a célula B, fazendo com que a célula B amadureça numa célula de plasma segregando níveis elevados de imunoglobulina solúvel.

CD40 é um antígeno 55 kDa da superfície celular presente na superfície tanto das células normais como nas células neoplásicas humanas B, células dendríticas, células apresentadoras de antígenos (APCs), células endoteliais, células monocíticas e epiteliais. As células transformadas de pacientes com linfomas de baixo e alto grau de células B, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crônica e doença de Hodgkin expressam CD40. A expressão de CD40 também é detectada em dois terços dos casos de leucemia mieloblástica aguda e em 50% de linfomas relacionados com SIDA. As células B malignas de diversos tumores da linhagem celular B expressam um alto grau de CD40 e parecem depender da sinalização de CD40 para a sobrevivência e proliferação.

Os linfomas imunoblásticos de células B frequentemente surgem em indivíduos imunocomprometidos, como pacientes transplantados e outros que recebem terapia imunossupressora de longo prazo, pacientes com SIDA e pacientes com síndromes de imunodeficiência primária, como síndrome linfoproliferativa X-ligado ou síndrome de Wiscott-Aldrich (Thomas et al. (1991) Adv. Cancer Res. 57:329; Straus et al. (1993) Ann. Intern. Med. Chem. 118:45).

O antígeno CD40 está relacionado com o receptor do factor de crescimento do nervo humano (NGF), receptor do fator- α de necrose tumoral (TNF- α), e Fas, sugerindo que o CD40 é um receptor para um ligando com funções importantes na ativação de células-B. A expressão de CD40 nas APCs desempenha um importante papel co-estimulador na ativação tanto de linfócitos T auxiliares e de linfócitos T citotóxicos. O receptor CD40 é expresso em células T ativadas, plaquetas ativadas e células do músculo liso

vascular inflamado. Os receptores de CD40 também podem ser encontrados em eosinófilos, membranas sinoviais na artrite reumatoide, fibroblastos dérmicos e outros tipos de células não linfóides. A ligação de CD40L ao receptor CD40 estimula a proliferação de células B e a diferenciação, a produção de anticorpos, isotipo de comutação e geração de células B de memória.

As WO 01/83755 e WO 02/28904 descrevem anticorpos capazes de se ligar a CD40, métodos para produzir estes anticorpos e métodos para a sua utilização.

Ellmark et al. (Immunology 2002, 106, 456-463) refere-se à modulação da interação do ligando CD40-CD40 usando fragmentos de anticorpos de cadeia simples anti-CD40 humanos.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano, para utilização no tratamento de um cancro caracterizado pela expressão de CD40, em que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 humano é selecionado a partir do grupo constituído por:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítipo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal CHIR-5.9 obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como a Patente de Depósito n° PTA-5542 ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como a Patente de Depósito n° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-87 da sequência de CD40 humano apresentada na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-89 da sequência de CD40 humano apresentada na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12; e

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

em que o referido anticorpo é administrado em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos.

BREVE SUMÁRIO DA DIVULGAÇÃO

As composições e os métodos são divulgados para o tratamento de doenças mediadas pela estimulação da sinalização de CD40 em células que expressam CD40, incluindo linfomas, doenças autoimunes e rejeições de transplantes. As composições incluem anticorpos monoclonais capazes de se ligar a um antígeno CD40 humano localizado na superfície de uma célula que expressa CD40 humano, em que a ligação evita o crescimento ou diferenciação da célula. As composições também incluem anticorpos monoclonais capazes de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula que expressa o CD40 humano, sendo o referido anticorpo monoclonal isento de atividade agonista significativa, em que a administração do referido anticorpo monoclonal

resulta num volume significativamente menor do tumor do que a concentração semelhante do anticorpo monoclonal anti-CD20 quimérico IDEC-C2B8 num modelo de tumor de xenoenxerto de ratinho nu encenado usando a linha celular Daudi de células B de linfoma humano. As composições incluem também fragmentos de ligação do antígeno destes anticorpos monoclonais, linhas celulares de hibridoma que produzem esses anticorpos e moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam as sequências de aminoácidos destes anticorpos monoclonais. Também são descritos aqui composições farmacêuticas que compreendem estes anticorpos anti-CD40 num transportador farmacêuticamente aceitável.

São revelados métodos para a prevenção ou tratamento de uma doença mediada pela estimulação da sinalização de CD40, compreendendo o tratamento do doente com um anticorpo anti-CD40 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que é isento de atividade agonista significativa quando ligado a um antígeno CD40 numa célula expressando CD40 humano. Doenças mediadas por estimulação de células que expressam CD40 incluem as doenças autoimunes, cancros e rejeições de enxertos de órgãos e tecidos. Os linfomas que podem ser tratadas ou prevenidas por um método como aqui divulgado incluem linfomas não-Hodgkin (linfomas de alto grau, linfomas de grau intermédio e os linfomas de baixo grau), doença de Hodgkin, leucemias linfoblásticas agudas, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas e leucemias mieloblásticas.

Doenças autoimunes particulares contempladas no tratamento, utilizando os métodos aqui descritos incluem o lúpus eritematoso sistémico (LES), artrite reumatoide, doença de Crohn, psoríase, púrpura trombocitopénica autoimune,

esclerose múltipla, espondilite anquilosante, miastenia gravis e pênfigo vulgar. Tais anticorpos podem também ser utilizados para prevenir a rejeição de enxertos de órgãos e tecidos pela supressão de respostas autoimunes, para tratar linfomas pela privação dos linfócitos B malignos do sinal ativador fornecido pelo CD40 e para entregar toxinas para células CD40 de um modo específico.

Os métodos para a inibição do crescimento, diferenciação e/ou proliferação de células B humanas, e para inibir a produção de anticorpos pelas células B num paciente humano são divulgados como são métodos para inibir o crescimento de células cancerosas de uma linhagem de células-B. Métodos para a identificação de anticorpos que possuem atividade antagonista contra as células que expressam CD40 são também revelados.

Os anticorpos monoclonais aqui divulgados têm uma forte afinidade para o CD40, e são caracterizados por uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) de pelo menos 10^{-6} M, preferencialmente de pelo menos cerca de 10^{-7} M a cerca de 10^{-8} M, mais preferencialmente pelo menos cerca de 10^{-8} M a cerca de 10^{-12} M. Os anticorpos monoclonais e os fragmentos de ligação ao seus antígenos que são adequados para utilização nos métodos aqui descritos são capazes de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana. São livres de atividade agonista significativa, mas exibem atividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 em células humanas. Numa concretização, o anticorpo anti-CD40 ou o seu fragmento exibe atividade antagonista quando ligado ao antígeno CD40 nas células B humanas normais. Noutra concretização, o anticorpo anti-CD40 ou o seu fragmento

exibe atividade antagonista quando ligado ao antígeno CD40 nas células B malignas humanas. Os anticorpos monoclonais adequados possuem regiões constantes humanas; de preferência também possuem regiões de estrutura parcialmente ou totalmente humanizadas; e mais preferencialmente são anticorpos totalmente humanos ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Exemplos de tais anticorpos monoclonais são os anticorpos aqui designados como CHIR-5.9 e CHIR-12.12; os anticorpos monoclonais produzidos pelas linhas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (aqui referida como a linha celular 5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (aqui referida como a linha celular 12.12); um anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de entre o grupo consistindo na sequência apresentada em SEQ ID N°: 6, a sequência mostrada em SEQ ID N°: 7, a sequência mostrada na SEQ ID N°: 8, ambas as sequências mostradas na SEQ ID N°: 6 e SEQ ID N°: 7, e ambas as sequências mostradas na SEQ ID N°: 6 e SEQ ID N°: 8; um anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de entre o grupo consistindo na sequência apresentada em SEQ ID N°: 2, a sequência mostrada em SEQ ID N°: 4, a sequência apresentada na SEQ ID N°: 5, ambas as sequências mostradas na SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, e ambas as sequências mostradas na SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 5; um anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótideos selecionada a partir do grupo consistindo na sequência apresentada em SEQ ID N°: 1, a sequência mostrada em SEQ ID N°: 3, e ambas as sequências mostradas na SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 3; e os fragmentos de ligação ao antígeno destes anticorpos monoclonais que retêm a capacidade de se ligar especificamente ao CD40 humano, e que estão isentos de atividade agonista

significativa, mas exibem atividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 em células humanas. Exemplos de tais anticorpos monoclonais incluem igualmente um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma 12.12; de um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-87 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12; um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 num ensaio de ligação competitiva; e um anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou de qualquer dos anticorpos monoclonais anteriores, onde o fragmento conserva a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 humano. Os peritos na técnica reconhecerão que os anticorpos antagonistas e os fragmentos de ligação ao antígeno destes anticorpos aqui descritos incluem anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que são produzidos de forma recombinante utilizando métodos bem conhecidos na técnica e aqui descrito a seguir, e incluem, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12, que foram produzidos de forma recombinante.

Numa forma de realização aqui descrita, os métodos de tratamento compreendem a administração a um paciente de uma dose terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo os anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. Uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 ou do seu fragmento é na gama a partir de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre

cerca de 3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, desde cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, ou desde cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. É reconhecido que o método de tratamento pode compreender uma única administração de uma dose terapeuticamente eficaz ou administrações múltiplas de uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui identificados como sendo adequados para utilização nos métodos aqui descritos podem ser modificados. Modificações destes anticorpos antagonistas anti-CD40 incluem, mas não estão limitados a, anticorpos quiméricos anti-CD40 imunologicamente ativos, anticorpos anti-CD40 humanizados e anticorpos anti-CD40 murinos imunologicamente ativos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra a ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 a CD40 sobre a superfície da linha celular de linfoma (Ramos).

As Figuras 2A e 2B ilustram as propriedades de ligação dos anticorpos monoclonais anti-CD40 CHIR-5.9 e CHIR-12.12 relativas ao ligando CD40. A Figura 2A mostra que a ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 para a superfície da célula de CD40 evita a subsequente ligação ao ligando CD40. A Figura 2B mostra que os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 podem competir fora do ligando CD40 pré-ligado à superfície celular CD40.

As Figuras 3A e 3B mostram a atividade ADCC dos anticorpos monoclonais candidatos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 contra as células cancerosas a partir dos gânglios linfáticos de pacientes com linfoma não-Hodgkin (NHL). As células NK enriquecidas de um dador voluntário normal, quer frescas após isolamento (Figura 3A) ou após cultura durante a noite a 37°C (Figura 3B), foram utilizadas como células efectoras neste ensaio. Como as células NHL também expressam CD20, o antígeno alvo para o rituximab (Rituxan®), a atividade ADCC dos mAbs candidatos foi comparada com aquela ofrituximab.

A Figura 4 demonstra a atividade antitumoral *in vivo* dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 comparada com a do rituximab usando um modelo de linfoma das células B do xenoenxerto não faseado de ratinho nu (Namalwa).

A Figura 5 demonstra a atividade antitumoral *in vivo* dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 comparada com a do rituximab usando um modelo de linfoma das células B do xenoenxerto não faseado de ratinho nu (Daudi). RC, a resistência do tumor ao desafio.

A Figura 6 demonstra a atividade antitumoral *in vivo* dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 comparada com a do rituximab usando um modelo do linfoma de células B do xenoenxerto faseado de ratinho nu (Daudi). CR, regressão completa.

A Figura 7 mostra o protocolo utilizado para a determinação do número de moléculas de CD20 e CD40 nas células Namalwa e Daudi.

A Figura 8 mostra a ADCC comparativa do mAb CHIR-12.12 e rituximab, contra as células Daudi do linfoma.

A Figura 9 apresenta quatro sequências de aminoácidos para as cadeias leve e pesada do mAb CHIR-12.12. As regiões líder (resíduos 1-20 da SEQ ID N°: 2), variáveis (resíduos 21-132 da SEQ ID N°: 2) e constantes (resíduos 133-239 da SEQ ID N°: 2) de cadeia leve são mostradas na Figura 9A. As regiões líder (resíduos 1-19 da SEQ ID N°: 4), variáveis (resíduos 20-139 da SEQ ID N°: 4) e constantes (resíduos 140-469 da SEQ ID N°: 4) de cadeia pesada são apresentadas na Figura 9B. A região constante alternativa para a cadeia pesada do mAb CHIR-12.12 apresentada na Figura 9B reflete uma substituição de um resíduo de serina em vez do resíduo de alanina na posição 153 da SEQ ID N°: 4. A sequência completa para esta variante da cadeia pesada do mAb CHIR-12.12 está estabelecida na SEQ ID N°: 5.

A Figura 10 mostra a sequência de codificação para a cadeia leve (Figura 10A; SEQ ID N°: 1) e cadeia pesada (Figura 10B, SEQ ID N°: 3) para o mAb CHIR-12.12.

A Figura 11 apresenta quatro sequências de aminoácidos para as cadeias leve e pesada do mAb CHIR-5.9. As regiões líder (resíduos 1-20 da SEQ ID NO: 6), variáveis (resíduos 21-132 da SEQ ID N°: 6) e constantes (resíduos 133-239 da SEQ ID N°: 6) de cadeia leve são mostradas na Figura 11A. As regiões líder (resíduos 1-19 da SEQ ID N°: 7), variáveis (resíduos 20-144 da SEQ ID N°: 7) e constantes (resíduos 145-474 da SEQ ID N°: 7), de cadeia pesada são apresentadas na Figura 11B. A região constante alternativa para a cadeia pesada do mAb CHIR-5.9 apresentada na Figura 11B reflete uma substituição de um resíduo de serina em vez do resíduo de alanina na posição 158 da SEQ ID N°: 7. A sequência completa para esta variante da cadeia pesada do mAb CHIR-5.9 está estabelecida na SEQ ID N°: 8.

A Figura 12 mostra a sequência de codificação (Figura 12A; SEQ ID N°: 9) para a isoforma curta do CD40 humano (sequência de aminoácidos mostrada na Figura 12B, SEQ ID N°: 10), e a sequência de codificação (Figura 12C, SEQ ID N°: 11) para a isoforma longa do CD40 humano (sequência de aminoácidos mostrada na Figura 12D).

A Figura 13 mostra a temperatura de fusão térmica de CHIR-12.12 em diferentes formulações de pH medida por calorimetria de varrimento diferencial (DSC).

DESCRIÇÃO DETALHADA

O escopo da presente invenção é definido pelas reivindicações e qualquer informação que não se enquadra dentro das reivindicações é fornecido apenas para informação. "Tumor", como aqui utilizado, refere-se a todo o crescimento e proliferação de células neoplásicas, quer seja maligno ou benigno, e todas as células e tecidos pré-cancerosos e cancerosos.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem, mas não estão limitados a linfoma e leucemia.

"Anticorpos" e "imunoglobulinas" (Ig) são glicoproteínas possuindo as mesmas características estruturais. Enquanto os anticorpos exibem especificidade de ligação a um antígeno, as imunoglobulinas incluem tanto os anticorpos e como outras moléculas semelhantes a anticorpos que não têm especificidade de antígeno. Os polipeptídeos do último

tipo são, por exemplo, produzidos em baixos níveis pelo sistema linfático e em níveis aumentados pelos mielomas.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais lato e abrange anticorpos completamente montados, fragmentos de anticorpos que se podem ligar a antigénios (por exemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticorpos de cadeia simples, diacorpos, e os péptidos recombinantes compreendendo os anteriores.

O termo "anticorpo monoclonal", tal como aqui utilizado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos, ou seja, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores.

"Anticorpos nativos" e "imunoglobulinas nativas" são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150000 daltons, compostas por duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfureto covalente, enquanto o número de ligações dissulfureto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve tem também pontes de dissulfureto intracadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (V_H) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa extremidade (V_L) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o

domínio variável da cadeia pesada. Resíduos de aminoácido particulares são acreditados para formar uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada.

O termo "variável" refere-se ao facto de certas porções dos domínios variáveis diferirem extensivamente em sequência entre os anticorpos e serem utilizados na ligação e especificidade de cada anticorpo particular para o seu antígeno particular. No entanto, a variabilidade não está uniformemente distribuída ao longo dos domínios variáveis de anticorpos. Está concentrada em três segmentos chamados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis, tanto nos domínios variáveis de cadeia leve como de cadeia pesada. As partes mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas de regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve nativas compreendem cada um quatro regiões FR, que adoptam largamente uma configuração de folha- β , ligadas por três CDR, que formam laços conectando e, em alguns casos, fazem parte, da estrutura de folha- β . As CDR em cada cadeia são mantidas juntas em estreita proximidade pelas regiões FR e, com as CDR da outra cadeia, contribuindo para a formação do sítio de ligação ao antígeno de anticorpos (veja Kabat et al. (1991) NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669).

Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efectoras, tais como receptores Fc (FcR) de ligação, participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpos, opsonização, iniciação da

citotoxicidade dependente do complemento, e degranulação dos mastócitos.

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

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região de ligação ao antigénio ou região variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F (ab')₂, e Fv; dímeros; anticorpos lineares (Zapata et al. (1995) *Protein Eng.* 8 (10):1057-1062); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. A digestão com papaína de anticorpos produz dois fragmentos idênticos de ligação ao antigénio, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de

ligação ao antígeno, e um fragmento residual "Fc", cujo nome reflete a sua capacidade para cristalizar facilmente. O tratamento com pepsina produz um $F(ab')_2$ que possui dois sítios de combinação com o antígeno e é ainda capaz de ligação cruzada ao antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um antígeno completo de reconhecimento e sítio de ligação. Numa espécie Fv de duas cadeias, esta região consiste num dímero de um domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve em firme associação não-covalente. Numa espécie Fv de cadeia simples, um domínio variável de cadeia pesada e de cadeia leve podem ser covalentemente ligados por ligante peptídico flexível tal que as cadeias leve e pesada possam associar-se numa estrutura "dimérica" análoga a essa numa espécie de Fv de duas cadeias. É nesta configuração que as três CDR de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação ao antígeno sobre a superfície do dímero V_H-V_L . Colectivamente, as seis CDR conferem especificidade de ligação do antígeno ao anticorpo. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDR específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e ligar o antígeno, embora com uma menor afinidade do que o sítio de ligação completo.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem dos fragmentos Fab' pela adição de alguns resíduos no terminal carboxi do domínio C_{H1} da cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. $Fab'-SH$ é a designação aqui utilizada para o Fab' no qual o resíduo de cisteína dos domínios constantes suportam um grupo tiol livre. Os

fragmentos de anticorpo $F(ab')_2$ foram originalmente produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas de dobradiça entre eles. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpo são também conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de quaisquer espécies de vertebrados podem ser atribuídas a um de dois tipos claramente distintos, denominados kapa (κ) e lambda (λ), com base nas sequências de aminoácidos dos seus domínios constantes.

Dependendo da sequência de aminoácidos do domínio constante das suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco classes principais de imunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias destas podem ser adicionalmente divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são denominados alfa, delta, épsilon gama e mu, respectivamente. As estruturas de subunidade e as configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Isotipos diferentes têm diferentes funções efectoras. Por exemplo, os isotipos IgG1 e IgG3 humanos medeiam a atividade de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC).

A palavra "marcador" quando aqui utilizada refere-se a um composto ou composição que é conjugada direta ou indiretamente com o anticorpo de modo a gerar um anticorpo "marcado" detectável. O marcador pode ser detectável por si próprio (por exemplo, marcadores de radioisótopos ou

marcadores fluorescentes) ou, no caso de um marcador enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou composição de substrato que é detectável. Os radionuclídeos que podem servir como marcadores detectáveis incluem, por exemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 e Pd-109. O marcador também pode ser uma entidade não-detectável como uma toxina.

O termo "antagonista" é utilizado no sentido mais lato, e inclui qualquer molécula que parcial ou completamente bloqueia, inibe ou neutraliza uma atividade biológica de um alvo nativo aqui divulgado ou a transcrição ou a tradução do mesmo.

"Transportadores" tal como aqui usados incluem transportadores farmacologicamente aceitáveis, excipientes ou estabilizadores que não sejam tóxicos para a célula ou mamífero exposto aos mesmos, nas dosagens e concentrações empregues. Frequentemente, o transportador fisiologicamente aceitável é uma solução aquosa de pH tamponado. Exemplos de transportadores fisiologicamente aceitáveis incluem tampões tais como fosfato, citrato, succinato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes, incluindo ácido ascórbico; polipeptídeos de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina do soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, arginina ou lisina; monossacáridos, dissacáridos e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes, tais como EDTA; álcoois de açúcar, tais como manitol ou sorbitol; contra-íões formando por sais, tais como sódio; e/ou agentes tensioativos não iónicos tais como TWEEN,

polietilenoglicol (PEG), e Pluronic. Administração "em combinação com" um ou mais agentes terapêuticos inclui a administração simultânea (concorrente) e consecutiva em qualquer ordem.

Uma "célula hospedeira", tal como é aqui utilizado, refere-se a um microrganismo ou uma célula eucariótica ou linha de células cultivadas como uma entidade unicelular que podem ser ou tenham sido, usadas como um receptor para um vector recombinante ou outros polinucleótideos de transferência e incluem a descendência da célula original que foi transfectada. Entende-se que a descendência de uma célula única pode não ser necessariamente completamente idêntica em morfologia ou em ADN genómico ou de complemento total, como o progenitor original devido a mutação natural, acidental ou deliberada.

"Células efectoras Humanos" são os leucócitos que expressam um ou mais FcRs e desempenham funções efectoras. Preferivelmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e realizam a função efectora de citotoxicidade mediada por células (ADCC) dependente de antigénio. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC), células assassinas naturais (NK), monócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, com células PBMC e NK sendo preferidas. Anticorpos que possuem atividade ADCC são tipicamente do isotipo IgG1 ou IgG3. Note-se que para além de isolar anticorpos IgG1 e IgG3, tais anticorpos que medeiam ADCC podem ser feitos através de manipulação de uma região variável de um anticorpo não-ADCC, ou fragmento da região variável de uma região constante do isotipo IgG1 ou IgG3.

Os termos "receptor de Fc" ou "FcR" são utilizados 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 um que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses FcγRI, FcγRII e FcγRIII, incluindo variantes alélicas e formas de splicing alternativo destes receptores. Os receptores FcγRII incluem FcγRIIA (um "receptor ativador") e FcγRIIB (um "receptor de inibição"), que têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem primariamente nos domínios citoplasmáticos dos mesmos. A ativação do receptor FcγRIIA contém um motivo de ativação à base do imunorreceptor de tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O receptor de inibição FcγRIIB contém um motivo imunorreceptor de inibição baseado em tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático (ver Daeron (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:203-234). Os FcRs são revistos em Ravetch e Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-9.92 (1991); Capel et al. (1994) Immunomethods 4:25-34, e de Haas et al. (1995) J. Lab. Clin. Med. Chem. 126:330-341. Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são englobados pelo termo "FcR" aqui utilizado. O termo inclui também o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgG materna para o feto (Guyer et al. (1976) J. Immunol. 117:587 e Kim et al. (1994) J. Immunol. 24:249 (1994)).

Há um certo número de maneiras de fazer anticorpos humanos. Por exemplo, as células secretoras podem ser imortalizadas por infecção com o vírus de Epstein-Barr (EBV). Contudo, as células infectadas com EBV são difíceis de clonar e produzem habitualmente apenas rendimentos relativamente baixos de imunoglobulina (James e Bell (1987) J. Immunol.

Mhethods 100:5-40). No futuro, a imortalização de células B humanas pode ser obtida através da introdução de uma combinação definida de genes de transformação. Tal possibilidade é realçada por uma recente demonstração de que a expressão da subunidade catalítica da telomerase, juntamente com a grande oncoproteína de SV40 e um alelo oncogénico de H-ras resultou na conversão tumorigénica de células epiteliais e de fibroblastos humanos normais (Hahn et al. (1999) Nature 400:464-468). É agora possível produzir animais transgénicos (por exemplo, ratinhos) que são capazes, após imunização, de produzir um repertório de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena (Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Lonberg e Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93; Fishwild et al. (1996) Nat. Biotechnol. 14:845-851; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156; Green (1999) J. Immunol. Mhethods 231:11-23; Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727; revistos em Little et al. (2000) Immunol. Today 21:364-370). Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica da região de união de cadeia pesada do anticorpo (gene J_H) em ratinhos mutantes quiméricos e de linha germinal resulta na inibição completa da produção de anticorpos endógenos (Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555). A transferência da matriz de linha germinal do gene da imunoglobulina humana em tais ratinhos mutantes de linha germinal resulta na produção de anticorpos humanos após desafio com antígeno (Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258). Mendez et al. (1997) (Nature Genetics 15:146-156) geraram uma linha de ratinhos transgénicos que, quando estimulados com um antígeno, gera anticorpos totalmente humanos de elevada afinidade. Isto foi conseguido através da integração da linha germinal da megabase de loci cadeia pesada e de cadeia leve humana em ratos com supressão no

segmento J_H endógeno, tal como descrito acima. Estes ratos (tecnologia XenoMouse[®] II (Abgenix; Fremont, Califórnia)) alojam 1020 kb de locus da cadeia pesada humana contendo cerca de 66 genes V_H, regiões completas D_H e J_H, e três regiões constantes diferentes, e também alojam 800 kb do locus humano K contendo 32 genes V_K, segmentos J_K e genes C_K. Os anticorpos produzidos nesses ratos assemelham-se aos observados em seres humanos em todos os aspectos, incluindo o rearranjo genético, montagem e repertório. Os anticorpos humanos são expressos preferencialmente sobre anticorpos endógenos, devido à deleção no segmento endógeno que evita o rearranjo genético no locus murino. Tais ratinhos podem ser imunizados com um antígeno de particular interesse.

Os soros de tais animais imunizados podem ser rastreados quanto à reatividade de anticorpos contra o antígeno inicial. Os linfócitos podem ser isolados a partir de células de nódulos linfáticos ou do baço e podem ainda ser selecionados para as células B por seleção de células CD138 negativas e CD19 positivas. Num aspecto, tais culturas de células B (CBCs) podem ser fundidas com células do mieloma para gerar hibridomas, como detalhado acima.

Num outro aspecto, tais culturas de células B podem ser rastreadas, ainda, para a reatividade contra o antígeno inicial, de preferência. Tal rastreio inclui ELISA com a proteína alvo/antígeno, um ensaio de competição com anticorpos conhecidos que se ligam ao antígeno de interesse, e na ligação de células CHO transitoriamente transfectadas ou outras células que expressam o antígeno alvo *in vitro*.

A presente descrição refere-se a composições e métodos para o tratamento de pacientes humanos com doenças mediadas pela estimulação da sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Os métodos envolvem o tratamento com um anticorpo anti-CD40 da invenção, ou um fragmento de ligação ao antígeno, em que a administração do anticorpo, ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, promove uma resposta terapêutica positiva no paciente submetido a este método de terapia. Os anticorpos anti-CD40 adequados para uso nos métodos da invenção ligam-se especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana, e estão livres de atividade agonista significativa, mas exibem atividade antagonista quando ligados ao antígeno CD40 numa célula que expressa CD40 humano. Estes anticorpos anti-CD40 e os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos são aqui referidos como anticorpos antagonistas anti-CD40. Tais anticorpos incluem, mas não estão limitados a, anticorpos monoclonais inteiramente humanos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 abaixo descritos e anticorpos monoclonais que possuem as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Os peritos na técnica reconhecerão que os anticorpos antagonistas e os fragmentos de ligação ao antígeno destes anticorpos aqui descritos incluem anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que são produzidos de forma recombinante utilizando métodos bem conhecidos na técnica e aqui descritos a seguir, e incluem, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12, que foram produzidos de forma recombinante.

Os anticorpos que possuem as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 incluem os anticorpos que interferem competitivamente com a ligação de

CD40 e/ou se ligam aos mesmos epítomos como CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Um perito pode determinar se um anticorpo interfere competitivamente com CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 utilizando métodos padrão.

Quando estes anticorpos se ligam a CD40 exibida na superfície de células humanas, tais como células B humanas, os anticorpos são livres de atividade agonista significativa; em algumas formas de realização, a sua ligação ao CD40, exibida na superfície das células humanas resulta na inibição da proliferação e diferenciação destas células humanas. Assim, os anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados para uso nos métodos da invenção incluem aqueles anticorpos monoclonais que podem exibir atividade antagonista em relação às células humanas normais e malignas que expressam o antigénio CD40 da superfície da célula.

Em algumas formas de realização, os anticorpos anti-CD40 da invenção exibem um aumento da atividade anti-tumoral em relação a do anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20 IDEC-C2B8, em que a atividade anti-tumoral é testada com quantidades equivalentes destes anticorpos num modelo de tumor de xenoenxerto de ratinho nu utilizando linhas de células de linfoma humano. O IDEC-C2B8 (IDEC Pharmaceuticals Corporation, San Diego, Califórnia, disponível comercialmente sob o nome comercial de Rituxan®, também conhecido como rituximab) é um anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20 contendo IgG1 humana e regiões constantes kapa com regiões variáveis de murino isoladas de um anticorpo monoclonal anti-CD20 de murino, IDEC-2B8 (Reff et al. (1994) Blood 83:435-445). O Rituximab® está licenciado para tratamento da recidiva de baixo grau de

células B ou linfoma não-Hodgkin folicular (NHL). A descoberta de anticorpos com atividade anti-tumoral superior em comparação com Rituximab® pode melhorar drasticamente os métodos de terapia de cancro para os linfomas de células B, particularmente, o linfoma de células B não-Hodgkin.

Modelos de xenoenxerto de tumores de ratinho nu adequados incluem aqueles que utilizam as linhas celulares de linfoma de Burkitt humano conhecidas como Namalwa e Daudi. Concretizações preferidas testam a atividade anti-tumoral num modelo de tumor de xenoenxerto faseado de ratinho nu utilizando a linha de células de linfoma humano de Daudi como aqui descrito abaixo no Exemplo 17. Um modelo de tumor de xenoenxerto faseado de ratinho nu utilizando a linha celular de linfoma de Daudi é mais eficaz na distinção da eficácia terapêutica de um determinado anticorpo que um modelo não faseado, na medida em que no modelo de anticorpo faseado a dosagem é iniciada apenas após o tumor ter atingido um tamanho mensurável. No modelo não faseado, a dosagem de anticorpo é geralmente iniciada dentro de cerca de 1 dia após a inoculação do tumor e antes de um tumor palpável estar presente. A capacidade de um anticorpo para superar Rituxan® (isto é, exibir um aumento da atividade anti-tumoral) num modelo faseado é uma forte indicação de que o anticorpo vai ser mais eficaz terapeuticamente do que o Rituxan®. Além disso, no modelo de Daudi, o anti-CD20, o alvo para o Rituxan® é expresso na superfície da célula a um nível mais elevado do que o CD40.

Por "quantidade equivalente" do anticorpo anti-CD40 da invenção e Rituxan® entende-se a mesma dose expressa em mg que é administrada numa base por peso. Assim, quando o

anticorpo anti-CD40 da presente invenção é administrado em doses de 0,01 mg/kg de peso corporal do ratinho usado no modelo tumoral, o Rituxan® também é doseado a 0,01 mg/kg de peso corporal do rato. Da mesma forma, quando o anticorpo CD40 da invenção é administrado em doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg de peso corporal do ratinho usado no modelo tumoral, o Rituxan® também é doseado a 0,1, 1 ou 10 mg/kg, respectivamente, do peso do corpo do rato.

Quando administrado no modelo de tumor de xenoinxerto de ratinho nu, alguns anticorpos da presente invenção resultam no volume tumoral significativamente menor do que uma quantidade equivalente de Rituxan®. Assim, por exemplo, o anticorpo monoclonal totalmente humano CHIR-12.12 apresenta pelo menos um aumento de 20% na atividade anti-tumoral em relação à observada com uma dose equivalente de Rituxan quando testados no modelo de tumor de xenoinxerto faseado de ratinho nu usando a linha de células do linfoma humano de Daudi do modo descrito nos Exemplos aqui abaixo, e podem exibir tanto quanto um aumento de 50% a 60% da atividade anti-tumoral neste ensaio. Esta atividade maior anti-tumoral reflete-se na maior redução no volume do tumor observada com o anticorpo anti-CD40 da presente invenção quando comparada com uma dose equivalente de Rituxan®. Assim, por exemplo, dependendo do período de tempo após a inoculação do tumor, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 pode apresentar um volume de tumor que é de cerca de um terço até cerca de metade que a observada para uma dose equivalente de Rituxan®.

Outra diferença na eficácia de anticorpos é medir *in vitro*, a concentração de anticorpo necessária para obter a máxima lise de células tumorais *in vitro* na presença de células

NK. Por exemplo, os anticorpos anti-CD40 da invenção alcançam a lise máxima de células de Daudi numa EC50 em menos de $\frac{1}{2}$, e de preferência $\frac{1}{4}$, e mais preferivelmente, 1/10 da concentração de Rituxan®.

Em adição ao anticorpo monoclonal CHIR-12.12, outros anticorpos anti-CD40 que partilham as características de ter significativamente maior eficácia do que as quantidades equivalentes de Rituxan® nos ensaios acima descritos incluem, mas não estão limitados a: (1) anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma 12.12; (2) anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada entre o grupo que consiste na sequência de SEQ ID N°: 2, na sequência de SEQ ID N°: 4, na sequência de SEQ ID N°: 5, em ambas as sequências de SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, e em ambas as sequências de SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 5; (3) anticorpo monoclonal tendo uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótideos selecionada a partir do grupo que consiste na sequência de nucleótideos da SEQ ID N°: 1, a sequência de nucleótideos da SEQ ID N°: 3, e ambas as sequências de SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 3; (4) anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma 12.12; (5) anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-87 da sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12; (6) anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 num ensaio de ligação competitiva; e (7) anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação ao antígeno do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou os anticorpos monoclonais precedentes nos itens anteriores

(1)-(6), onde o fragmento conserva a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 humano.

Anticorpos Antagonistas anti-CD40

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

São divulgadas as sequências de nucleótideos e de aminoácidos das regiões variáveis do anticorpo CHIR-12.12, e as sequências de aminoácidos das regiões variáveis do anticorpo CHIR-5.9. Mais particularmente, as sequências de aminoácidos para as regiões líder, variáveis e constantes de cadeia leve e de cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12 são apresentadas nas Figuras 9A e 9B, respectivamente. Ver também a SEQ ID N°: 2 (sequência completa de cadeia leve do

mAb CHIR-12.12), a SEQ ID N°: 4 (sequência completa de cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12), e SEQ ID N°: 5 (sequência completa de uma variante da cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12 apresentada na SEQ ID N°: 4, em que a variante compreende uma substituição de serina para o resíduo alanina na posição 153 da SEQ ID N°: 4). As sequências de nucleótideos que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12 são apresentadas nas Figuras 11A e 11B, respectivamente. Ver também a SEQ ID N°: 1 (sequência de codificação de cadeia leve para o mAb CHIR-12.12), e SEQ ID N°: 3 (sequência de codificação de cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12). As sequências de aminoácidos para as regiões líder, variáveis e constantes de cadeia leve e de cadeia pesada do mAb CHIR-5.9 são apresentadas nas Figuras 10A e 10B, respectivamente. Ver também a SEQ ID N°: 6 (sequência completa de cadeia leve do mAb CHIR-5.9), a SEQ ID N°: 7 (sequência completa de cadeia pesada do mAb CHIR-5.9), e SEQ ID N°: 8 (sequência completa de uma variante da cadeia pesada do mAb CHIR-5.9 apresentada na SEQ ID N°: 7, em que a variante compreende uma substituição de serina para o resíduo alanina na posição 158 da SEQ ID N°: 7). Além disso, hibridomas expressando os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 foram depositados na ATCC com a designação de depósito de patente n°s PTA-5542 e PTA-5543, respectivamente.

Além disso para a atividade antagonista, é preferível que os anticorpos anti-CD40 desta invenção possuam outro mecanismo de ação contra uma célula de tumor. Por exemplo, os anticorpos nativos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 têm atividade ADCC. Alternativamente, as regiões variáveis dos anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 podem ser expressas em outro isotipo de anticorpo que tenha uma actividade ADCC. Também é

possível conjugar formas nativas, formas recombinantes ou fragmentos de ligação ao antigénio de CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 a uma citotoxina, um agente terapêutico, ou um ião de metal radioativo ou radioisótopo, como aqui referido abaixo.

Os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 ligam CD40 solúvel em ensaios do tipo ELISA, evitam a ligação ao ligando CD40 da superfície celular de CD40 e deslocam o ligando CD40pré-ligado tal como determinado por ensaios de citometria de fluxo. Os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 competem um com o outro para a ligação ao CD40, mas não com o 15B8, o anticorpo monoclonal anti-CD40 descrito na WO 02/28904. Quando testados *in vitro* os efeitos sobre a proliferação de células B de seres humanos normais, o CHIR-5.9 e CHIR-12.12 agem como anticorpos antagonistas anti-CD40. Além disso, o CHIR-5.9 e CHIR-12.12 não induzem a proliferação forte de linfócitos humanos de indivíduos normais. Estes anticorpos são capazes de matar as células alvo que expressam CD40 através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). A afinidade de ligação de CHIR-5.9 para o CD40 humano é $1,2 \times 10^{-8}$ M e a afinidade de ligação de CHIR-12.12 é 5×10^{-10} M, tal como determinado pelo ensaio Biacore™.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados para uso nos métodos da presente invenção exibem uma forte afinidade de ligação de sítio único para o antigénio de superfície celular CD40. Os anticorpos monoclonais da invenção exibem uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) para o CD40 de pelo menos 10^{-5} M, pelo menos, 3×10^{-5} M, preferencialmente pelo menos 10^{-6} M a 10^{-7} M, mais preferencialmente pelo menos 10^{-8} M a cerca de 10^{-12} M,

medido usando um ensaio padronizado como o Biacore™. A análise Biacore é conhecida na técnica e são fornecidos pormenores no "BIAapplications Handbook". Métodos descritos na WO 01/27160 podem ser utilizados para modular a afinidade de ligação.

Por "antigénio CD40", "antigénio CD40 da superfície celular", "receptor CD40", ou "CD40" entende-se uma glicoproteína transmembranar que pertence à família do receptor do factor de necrose tumoral (TNF) (ver, por exemplo, as Patentes US 5674492 e 4708871; Stamenkovic et al. (1989) EMBO 8:1403; Clark (1990) Tissue Antigens 36:33; Barclay et al. (1997) The Leucocyte Antigen Facts Book (2ª ed; Academic Press, San Diego)). Duas isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes de transcritos de splicing alternativo deste gene, têm sido identificadas. A primeira isoforma (também conhecido como "isoforma longa" ou "isoforma 1") é expressa como um precursor de polipeptídeo do aminoácido 277 (SEQ ID N°: 12 (reportada pela primeira vez com o número de acesso GenBank CAA43045, e identificada como isoforma 1 com o número de acesso GenBank NP_001241), codificado pela SEQ ID N°: 11 (ver n°s de Acesso GenBank X60592 e NM_001250)), que tem uma sequência de sinal representada pelos primeiros 19 resíduos. A segunda isoforma (também conhecido como "isoforma curta" ou "isoforma 2") é expressa como um precursor de polipeptídeo do aminoácido 203 (SEQ ID N°: 10 (número de acesso GenBank NP_690593), codificado pela SEQ ID N°: 9 (número de acesso GenBank NM_152854)), que tem também uma sequência de sinal representada pelos primeiros 19 resíduos. Os polipeptídeos precursores destas duas isoformas do CD40 humano partilham em comum os seus primeiros 165 resíduos (isto é, os resíduos 1-165 da SEQ ID

Nº: 10 e SEQ ID Nº: 12). O polipeptídeo precursor da isoforma curta (mostrada na SEQ ID Nº: 10) é codificado por uma variante de transcrito (SEQ ID Nº: 9) que não possui um segmento codificante, o que leva a uma mudança de estrutura de tradução; a isoforma de CD40 resultante contém um terminal C menor e distinto (resíduos 166-203 da SEQ ID Nº: 10), do que o contido na isoforma longa do CD40 (terminal C mostrado nos resíduos 166-277 da SEQ ID Nº: 12). Para os fins da presente invenção, o termo "antigénio CD40", "antigénio CD40 da superfície celular", "receptor CD40", ou "CD40" engloba tanto as isoformas curta e longa de CD40. Os anticorpos anti-CD40 da presente invenção ligam-se a um epítopo do CD40 humano que reside no mesmo local dentro da isoforma curta ou da isoforma longa deste antigénio de superfície celular, como aqui referido abaixo.

O antigénio CD40 é exibido na superfície de uma variedade de tipos de células, tal como aqui descrito noutro lado. Por "exibido na superfície" e "expresso na superfície" entende-se que a totalidade ou uma porção do antigénio CD40 é exposto no exterior da célula. O antigénio CD40 apresentado ou expresso pode ser total ou parcialmente glicosilado.

Por "atividade agonista" entende-se as funções da substância como um agonista. Um agonista combina-se com um receptor numa célula e inicia uma reação ou atividade que é similar ou idêntica à iniciada pelo ligando natural do receptor. Um agonista de CD40 induz qualquer uma, ou todas, mas não se limitando a, as seguintes reações: proliferação e diferenciação de células B, produção de anticorpos, adesão intercelular, geração de células B de memória, comutação de isótipos, sobre-regulação da expressão na

superfície celular de MHC de Classe II e CD80/86, e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-8, IL-12 e TNF. Por "atividade antagonista" entende-se as funções da substância como um antagonista. Um antagonista do CD40 evita ou reduz a indução de qualquer das respostas induzidas pela ligação do receptor CD40 a um ligando agonista, particularmente CD40L. O antagonista pode reduzir a indução de qualquer uma ou mais das seguintes respostas à ligação do agonista por 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, de preferência 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mais preferencialmente 70%, 80%, 85%, e mais preferencialmente 90%, 95%, 99%, ou 100%. Os métodos para medir o anticorpo anti-CD40 com especificidade de ligação ao ligando CD40 e a atividade antagonista são conhecidos para um perito na técnica e incluem, mas não estão limitados a, ensaios padrão de ligação competitiva, ensaios de controlo da secreção de imunoglobulina pelas células B, ensaios de proliferação de células-B, ensaios de proliferação de células B tipo Banchereau, ensaios de células T auxiliares para a produção de anticorpos, ensaios de co-estimulação de proliferação de células B, e ensaios para uma sobre-regulação de marcadores de ativação de células B. Ver, por exemplo, tais ensaios divulgados nas WO 00/75348 e Patente US 6087329.

Por atividade agonista "significativa" entende-se 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 controlo negativo, como medido num ensaio de resposta das células B. Preferencialmente, a 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 controlo negativo, como medido num ensaio de resposta das células B. Assim, por exemplo, onde a resposta de células B de interesse é a proliferação de células B, a atividade agonista "significativa", seria a indução de um nível de proliferação de células B que é pelo menos 2 vezes superior ou pelo menos 3 vezes maior do que o nível de proliferação de células B induzida por uma substância neutra ou um controlo negativo. Numa concretização, uma imunoglobulina não específica, por exemplo IgG1, que não se liga ao CD40 serve como controlo negativo. Uma substância "isenta de atividade agonista significativa" exibirá uma atividade agonista de não mais do que cerca de 25% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controlo negativo, preferencialmente não mais do que cerca de 20% maior, 15% maior, 10% maior, 5% maior, de 1% maior, 0,5% superior, ou até mesmo não mais do que cerca de 0,1% maior do que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou um controlo negativo, como medido num ensaio de resposta das células B. O antagonista de anticorpos anti-CD40 úteis nos métodos da presente invenção estão isentos de atividade agonista significativa, como mencionado acima, quando ligado a um antigénio CD40 numa célula humana. Numa forma de realização da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40, é isento de atividade agonista significativa numa resposta das células B. Numa outra forma de realização da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40, é isento de atividade agonista significativa em ensaios de mais do que uma resposta de células B (por exemplo, proliferação e diferenciação ou proliferação, diferenciação e produção de anticorpos).

Tal como aqui utilizado "anticorpo anti-CD40" abrange qualquer anticorpo que reconhece especificamente o antígeno de superfície CD40 de células B, incluindo anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos de cadeia simples, e seus fragmentos, tais como Fab, F(ab')₂, F_v e outros fragmentos que retêm a função de ligação ao antígeno do anticorpo-mãe anti-CD40. De particular interesse para a presente invenção são os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos que partilham as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 acima descritos. Tais anticorpos incluem, mas não estão limitados ao seguinte: (1) anticorpos monoclonais produzidos pelas linhas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (aqui referida como a linha celular 5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (referido aqui como a linha celular 12.12), depositadas na ATCC como Patente de Depósito n° PTA-5542 e a Patente de Depósito n° PTA-5543, respectivamente; (2) anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste na sequência mostrada em SEQ ID N°: 2, a sequência mostrada em SEQ ID N°: 4, a sequência apresentada na SEQ ID N°: 5, ambas as sequências apresentadas na SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4, e ambas as sequências apresentada em SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 5; (3) anticorpo monoclonal que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de entre o grupo consistindo na sequência apresentada em SEQ ID N°: 6, a sequência apresentada na SEQ ID N°: 7, a sequência apresentada na SEQ ID N°: 8, ambas as sequências apresentadas na SEQ ID N°: 6 e SEQ ID N°: 7, e ambas as sequências apresentadas na SEQ ID N°: 6 e SEQ ID N°: 8; (4) anticorpo monoclonal tendo uma sequência de aminoácidos codificada por uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de nucleótideos selecionada a partir do grupo

consistindo na sequência de nucleótideos apresentada na SEQ ID N°: 1, a sequência de nucleótideos apresentada na SEQ ID N°: 3, e ambas as sequências mostradas na SEQ ID N°: 1 e SEQ ID N°: 3; (5) anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha celular de hibridoma 5.9 ou pela linha celular de hibridoma 12.12; (6) anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-87 da sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12; (7) anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 num ensaio de ligação competitiva; e (8) anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação ao antígeno dos anticorpos monoclonais CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou os anticorpos monoclonais precedentes nos itens anteriores (1)-(7), onde o fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno CD40 humano.

Produção de anticorpos antagonistas anti-CD40

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos e para utilização nos métodos da presente invenção podem ser produzidos utilizando qualquer método de produção de anticorpos conhecido dos peritos na técnica. Assim, os soros policlonais podem ser preparados por métodos convencionais. Em geral, uma solução contendo o antígeno CD40 é primeiro usada para imunizar um animal adequado, preferencialmente um ratinho, rato, coelho ou cabra. Os coelhos ou as cabras são preferidos para a preparação de soros policlonais devido ao volume de soro obtido, e a disponibilidade de anticorpos anti-coelho e anti-cabra marcados.

Os soros policlonais podem ser preparados de um animal transgênico, de preferência um rato tendo loci de

imunoglobulinas humanas. Numa concretização preferida, as células Sf9 que expressam CD40, são usadas como o imunogénio. A imunização pode também ser realizada misturando ou emulsionando a solução contendo o antigénio em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante tal como o adjuvante completo de Freund, e injetando a mistura ou emulsão parentericamente (geralmente 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, de preferência usando o adjuvante incompleto de Freund. Pode-se, alternativamente, gerar anticorpos pela imunização *in vitro*, utilizando métodos conhecidos na técnica, o que para os fins da presente invenção é considerado equivalente à imunização *in vivo*. Antissoros policlonais são obtidos por sangria do animal imunizado para um recipiente de vidro ou de plástico, incubando o sangue a 25°C durante uma hora, seguida por incubação a 4°C durante 2-18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (por exemplo, 1000 x g durante 10 minutos). Cerca de 20-50 ml por sangramento podem ser obtidos a partir de coelhos.

A produção de células Sf 9 (*Spodoptera frugiperda*) é divulgada na Patente US 6004552, aqui incorporada por referência. Resumidamente, as sequências que codificam para o CD40 humano foram recombinadas num baculovirus usando vectores de transferência. Os plasmídeos foram co-transfectados com ADN de baculovirus do tipo selvagem em células Sf 9. As células Sf9 infectadas com o baculovirus recombinante foram identificadas e purificadas por clonagem.

De preferência, o anticorpo é monoclonal na natureza. Por "anticorpo monoclonal", entende-se um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades menores. O termo não é limitado em relação à espécie ou fonte do anticorpo. O termo abrange imunoglobulinas inteiras assim como fragmentos, tais como Fab, F(ab')₂, Fv e outros, que retêm a função de ligação ao antígeno do anticorpo. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigénico, isto é, o antígeno de superfície celular CD40, na presente invenção. Além disso, em contraste com as preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" indica o carácter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser entendido como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a ser utilizados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método do hibridoma primeiro descrito por Kohler et al. (1975) Nature 256:495, ou podem ser produzidos por métodos de ADN recombinante (ver, por exemplo, a Patente US 4816567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos, utilizando as técnicas descritas em, por exemplo, Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. Biol. 222:581-597; e Patente US 5514548.

Por "epítopo" entende-se a parte de uma molécula antigénica à qual um anticorpo é produzido e à qual o anticorpo se ligará. Os epítomos lineares podem compreender resíduos de aminoácidos (isto é, resíduos dentro do epítopo que estão dispostos sequencialmente um após o outro de um modo linear), resíduos de aminoácidos não-lineares (aqui referidos como "epítomos não lineares", estes epítomos não estão dispostos sequencialmente), ou ambos os resíduos de aminoácidos lineares e não lineares.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando o método de Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496, ou uma sua modificação. Tipicamente, um ratinho é imunizado com uma solução contendo um antígeno. A imunização pode ser realizada misturando ou emulsionando a solução contendo o antígeno em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante tal como o adjuvante completo de Freund, e injetando a mistura ou emulsão parentericamente. Qualquer método de imunização conhecido na técnica pode ser usado para obter os anticorpos monoclonais da invenção. Após a imunização do animal, o baço (e opcionalmente, vários nódulos linfáticos grandes) são removidos e dissociados em células individuais. As células do baço podem ser rastreadas aplicando uma suspensão celular numa placa ou poço revestido com o antígeno de interesse. As células B expressando a membrana específica de imunoglobulina ligada para o antígeno ligam-se à placa e não são enxaguadas. As células B resultantes, ou todas as células do baço dissociadas, são então induzidas a fundir-se com células do mieloma para formar hibridomas, e são cultivadas num meio seletivo. As células resultantes são plaqueadas por diluição em série e são testadas quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno de

interesse (e que não se ligam a antígenos não relacionados). O anticorpo monoclonal selecionado (mAb) que segrega hibridomas é então cultivado, quer *in vitro* (por exemplo, em garrafas de cultura de tecidos ou reatores de fibras ocas), ou *in vivo* (como ascites em ratinhos).

Quando os anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são ser preparados utilizando métodos de ADN recombinante, o ADN que codifica os anticorpos monoclonais é facilmente isolado e sequenciado utilizando procedimentos convencionais (por exemplo, por utilização de sondas de oligonucleótido que são capazes de se ligarem especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve de anticorpos de murino). As células de hibridoma aqui descritas servem como uma fonte preferida de tal ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vectores de expressão, que são então transfectados para células hospedeiras, tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) ou células de mieloma que não produzem de outro modo proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras recombinantes. Os artigos de revisão sobre a expressão recombinante em bactérias de ADN que codifica o anticorpo incluem Skerra et al. (1993) *Curr. Opin. in Immunol.* 5:256 e Phickthun (1992) *Immunol. Revs.* 130:151. Alternativamente, o anticorpo pode ser produzido numa linha celular tal como uma linha celular CHO, tal como descrito nas Patentes US 5545403; 5545405; e 5998144. Resumidamente a linha celular é transfectada com vectores capazes de expressar uma cadeia leve e uma cadeia pesada, respectivamente. Por transfecção das duas proteínas em vectores separados, os anticorpos

quiméricos podem ser produzidos. Outra vantagem é a glicosilação correta do anticorpo.

Em algumas concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é produzido em células CHO utilizando o sistema de expressão genética GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que utiliza a sintetase de glutamina como marcador. Veja também as Patentes US 5122464; 5591639; 5658759; 5770359; 5827739; 5879936; 5891693; e 5981216.

Os anticorpos monoclonais para CD40 são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, as secções dedicadas a antigénio de células B em McMichael, ed. (1987 e 1989) *Leukocyte Typing III e IV* (Oxford University Press, Nova Iorque); as Patentes US 5674492; 5874082; 5677165; 6056959; as Publicações Internacionais WO 00/63395, WO 02/28905 e WO 02/28904; Gordon et al. (1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle et al. (1989) *Eur. J. Immunol.* 19:1463; Clark et al. (1986) *PNAS* 83:4494; Paulie et al. (1989) *J. Immunol.* 142:590; Gordon et al. (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:1535; Jabara et al. (1990) *J. Exp. Med. Chem.* 172:1861; Zhang et al. (1991) *J. Immunol.* 146:1836; Gascan et al. (1991) *J. Immunol.* 147:8; Banchereau et al. (1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8; e Banchereau et al. (1991) *Science* 251:70. De particular interesse para a presente invenção são os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos que partilham as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 acima descritos.

O termo "epítopo do antígeno CD40", tal como aqui utilizado refere-se a uma molécula que é capaz de imunorreatividade com os anticorpos monoclonais anti-CD40 desta invenção, excluindo o próprio antígeno CD40. Epítopos do antígeno CD40 podem compreender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos e outras moléculas, mas para os fins da presente invenção são mais comumente proteínas, oligopéptidos curtos, mimicos de oligopéptidos (isto é, compostos orgânicos que imitam as propriedades de ligação de anticorpos do antígeno CD40), ou combinações destes. Imitadores de oligopéptidos apropriados encontram-se descritos, inter alia, no pedido PCT US 91/04282.

Além disso, o termo "anticorpo anti-CD40" tal como é aqui usado engloba anticorpos quiméricos anti-CD40, tais anticorpos quiméricos anti-CD40 para utilização nos métodos da invenção têm as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 descritos aqui. Por anticorpos "quiméricos" entende-se anticorpos que são mais preferencialmente derivados utilizando técnicas recombinantes de ácido desoxirribonucleico e que compreendem tanto componentes humanos (incluindo espécies imunologicamente "relacionadas", por exemplo, chimpanzé) e não-humanos. Assim, a região constante do anticorpo quimérico é muito preferivelmente substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo quimérico é mais preferencialmente derivada de uma fonte não humana e tem a especificidade antigénica desejada para o antígeno da superfície celular CD40. A fonte não humana pode ser qualquer fonte de vertebrado que possa ser usada para gerar anticorpos para um antígeno da superfície celular humana CD40 ou material

que compreende um antigénio da superfície celular humana CD40. Tais fontes não humanas incluem, mas não estão limitados a, roedores (por exemplo, coelho, rato, ratinho, etc.; ver, por exemplo, a Patente US 4816567) e primatas não-humanos (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, macaco, etc.; ver, por exemplo, as Patentes US 5750105 e 5756096). Tal como aqui utilizada, a frase "imunologicamente ativo" quando utilizado em referência aos anticorpos quiméricos anti-CD40, significa um anticorpo quimérico que se liga ao CD40 humano.

Os anticorpos anti-CD40 quiméricos e humanizados, também estão abrangidos pelo termo anticorpo anti-CD40 tal como aqui usado. Os anticorpos quiméricos compreendem segmentos de anticorpos derivados a partir de diferentes espécies. O Rituxan® é um exemplo de um anticorpo quimérico com uma região variável murina e uma região constante humana.

Por "humanizado" entende-se formas de anticorpos anti-CD40 que contêm a sequência mínima derivada de sequências de imunoglobulinas não-humanas. Para a maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) em que 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 dador) tal como ratinho, rato, coelho ou um primata não humano, possuindo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. A expressão "região determinante de complementaridade" refere-se a sequências de aminoácidos que em conjunto definem a afinidade de ligação e especificidade da região natural Fv de um sítio de ligação da imunoglobulina nativa. Ver, por exemplo,

Chothia et al (1987) J. Mol. Biol. Biol. 196:901-917; Kabat et al (1991), U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). A expressão "região constante" refere-se à porção da molécula de anticorpo que confere as funções efectoras. Em trabalhos anteriores dirigidos para a produção de anticorpos não-imunogénicos para utilização em terapia de doenças humanas, as regiões constantes de ratinho foram substituídas por regiões constantes humanas. As regiões constantes dos anticorpos humanizados dos sujeitos foram derivadas de imunoglobulinas humanas. No entanto, estes anticorpos humanizados ainda provocavam uma resposta imune indesejável e potencialmente perigosa em seres humanos e houve uma perda de afinidade. Os anticorpos anti-CD40 humanizados para uso nos métodos da presente invenção têm características de ligação semelhantes às exibidas pelos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui descritos.

A humanização pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colaboradores (Jones et al. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) Science 239:1534-1536), pela substituição de CDRs de roedores ou mutantes de roedores ou sequências de CDR para as sequências correspondentes de um anticorpo humano. Veja também as Patentes US 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205. Em alguns casos, os resíduos entre as regiões de estrutura de uma ou mais regiões variáveis da imunoglobulina humana são substituídos pelos correspondentes resíduos não humanos (ver, por exemplo, as Patentes US 5585089; 5693761; 5693762; e 6180370). Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo dador. Estas modificações são

feitas para refinar mais o desempenho do anticorpo (por exemplo, para obter a afinidade desejada). Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente a totalidade de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que todas ou substancialmente todas as regiões hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as regiões estruturais são as de uma sequência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes veja Jones et al. (1986) Nature 331:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; e Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596. Assim, estes anticorpos "humanizados" podem incluir anticorpos em que substancialmente menos de um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, os anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos em que alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos estruturais são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores. Ver, por exemplo, as Patentes US 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205. Veja também a Patente US 6180370, e a Publicação Internacional WO 01/27160, em que são divulgados os anticorpos humanizados e técnicas para a produção de anticorpos humanizados possuindo uma afinidade melhorada para um antígeno pré-determinado.

Também englobados pelo termo anticorpos anti-CD40 são anticorpos anti-CD40 xenogénicos ou modificados produzidos num hospedeiro mamífero não-humano, mais particularmente um ratinho transgénico, caracterizado por loci de

imunoglobulina (Ig) endógena inativada. Em tais animais transgênicos, os genes endógenos competentes para a expressão de subunidades leves e pesadas das imunoglobulinas do hospedeiro são tornados não-funcionais e substituídos com os loci de imunoglobulinas humanas análogos. Estes animais transgênicos produzem anticorpos humanos na ausência substancial de subunidades de imunoglobulina hospedeiras leves ou pesadas. Ver, por exemplo, as Patentes US 5877397 e 5939598.

De preferência, os anticorpos inteiramente humanos para CD40 são obtidos por imunização de ratinhos transgênicos. Um tal ratinho é obtido utilizando a tecnologia XenoMouse® (Abgenix, Fremont, California), e é revelado nas Patentes US 6075181, 6091001 e 6114598. Para produzir os anticorpos aqui divulgados, ratos transgênicos para o locus IgG₁ da cadeia pesada humana e locus κ de cadeia leve humana foram imunizados com células Sf 9 que expressam CD40 humano. Os ratos transgênicos podem também ser de outros isotipos. Os anticorpos totalmente humanos úteis nos métodos da presente invenção são caracterizados por propriedades de ligação semelhantes às exibidas pelos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui descritos.

Os fragmentos dos anticorpos anti-CD40 são adequados para utilização nos métodos da invenção, desde que retenham a afinidade desejada do anticorpo de comprimento completo. Assim, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 conservará a capacidade de se ligar ao antígeno de superfície celular B CD40. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades semelhantes do anticorpo antagonista anti-CD40 de comprimento completo correspondente, isto é, os fragmentos ligam-se especificamente a um antígeno CD40 humano

expresso à superfície de uma célula humana, e estão isentos de atividade agonista significativa, mas exibem antagonista atividade quando ligados a um antígeno CD40 numa célula humana que expressa CD40. Tais fragmentos são aqui referidos como "fragmentos de ligação ao antígeno".

Fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo adequados compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento completo, geralmente a região de ligação ao antígeno ou região variável do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, fragmentos Fab, $F(ab')_2$ e Fv e as moléculas de anticorpo de cadeia simples. Por "Fab" entende-se um fragmento monovalente de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina que é composto por uma cadeia leve e parte da cadeia pesada. Por $F(ab')_2$ entende-se um fragmento bivalente de ligação ao antígeno de uma imunoglobulina que compreende duas cadeias leves e parte de ambas as cadeias pesadas. Por fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "sFv" entende-se fragmentos compreendendo os domínios V_H e V_L de um anticorpo, em que estes domínios estão presentes numa única cadeia polipeptídica. Ver, por exemplo, as Patentes US 4946778, 5260203, 5455030 e 5856456. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende ainda um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L que permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de sFv ver Pluckthun (1994) em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, ed. Rosenberg e Moore (Springer-Verlag, Nova Iorque), pp 269-315. Fragmentos de ligação ao antígeno dos anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos também podem ser conjugados com uma citotoxina para efetuar a morte das células cancerosas alvo, tal como aqui descrito abaixo.

Os anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos geradas utilizando as técnicas descritas em, por exemplo, McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) e na Patente US 5514548. Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 e Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 descrevem o isolamento de anticorpos murinos e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicações subsequentes descrevem a produção anticorpos humanos de alta afinidade (intervalo nM) por cadeia baralhada (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), bem como a infecção combinatória e a recombinação *in vivo* como estratégia para a construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2265-2266). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis às técnicas tradicionais de hibridoma de anticorpo monoclonal para isolamento de anticorpos monoclonais.

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir das bibliotecas de fagos de anticorpos discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente a partir de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados

diretamente a partir de cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para o perito na técnica.

Anticorpos antagonistas anti-CD40 úteis nos métodos da presente invenção incluem os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12-12 aqui descritos, bem como anticorpos que diferem deste anticorpo, mas retendo as CDR; e anticorpos com uma ou mais de adições de aminoácidos, deleções ou substituições, em que a atividade antagonista é medida pela inibição da proliferação de células B e/ou diferenciação. A invenção engloba também anticorpos antagonistas anti-CD40 de-imunizados, que podem ser produzidos tal como descrito em, por exemplo, as Publicações Internacionais WO 98/52976 e WO 0034317. Desta maneira, os resíduos dentro dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção são modificados de modo a tornar os anticorpos não ou menos imunogênicos para os seres humanos, mantendo a sua atividade antagonista em relação às células que expressam o CD40 humano, em que esta atividade é medida por ensaios observados neste documento. Também incluídos dentro do âmbito das reivindicações são proteínas de fusão compreendendo um anticorpo antagonista anti-CD40 da invenção, ou um seu fragmento, cujas proteínas de fusão podem ser sintetizadas ou expressas a partir de vectores polinucleotídicos correspondentes, tal como é conhecido na técnica. Tais proteínas de fusão são descritas com referência a conjugação de anticorpos, como descrito abaixo.

Os anticorpos da presente invenção podem ter variações de sequência produzida utilizando métodos descritos em, por

exemplo, as Patentes EP 0 983 303 A1, WO 00/34317 e WO 98/52976. Por exemplo, demonstrou-se que as sequências dentro da CDR podem levar um anticorpo a ligar-se a MHC de Classe II e desencadear uma resposta de células T auxiliares indesejada. Uma substituição conservativa pode permitir que o anticorpo retenha a atividade de ligação perdendo, ainda, a sua capacidade de desencadear uma resposta de células T indesejada. Tais substituições conservativas ou não conservativas podem ser feitas usando métodos reconhecidos na técnica, tais como as mencionadas aqui, e os anticorpos resultantes irão cair dentro do âmbito da invenção. Os anticorpos variantes podem ser rotineiramente testados quanto à atividade antagonista, afinidade e especificidade usando os métodos aqui descritos.

Um anticorpo produzido por qualquer dos métodos descritos acima, ou por qualquer outro método não divulgado aqui, cairá dentro do âmbito da presente divulgação se possuir pelo menos uma das seguintes atividades biológicas: inibição da secreção de imunoglobulinas por células B periféricas humanas normais estimuladas por células T; inibição da sobrevivência e/ou a proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células T de Jurkat; inibição da sobrevivência e/ou a proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células que expressam CD40L ou o ligando CD40 solúvel (sCD40L); inibição de sinais intracelulares anti-apoptóticos de "sobrevivência" em qualquer célula estimulada por sCD40L ou CD40L em fase sólida; inibição da transdução de sinal de CD40 em qualquer célula após ligação com sCD40L ou CD40L em fase sólida; e inibição da proliferação de células B malignas humanas como indicado

abaixo. Estes ensaios podem ser realizados como descrito nos exemplos abaixo. Ver igualmente os ensaios descritos em Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444; e Patentes US 5674492 e 5847082.

Um ensaio representativo para detecção de anticorpos antagonistas anti-CD40 específicos para os epítomos do antígeno CD40 aqui identificados é um "ensaio de ligação competitiva". Ensaios de ligação competitiva são ensaios serológicos onde incógnitas são detectadas e quantificadas pela sua capacidade de inibir a ligação de um ligando marcado conhecido ao seu anticorpo específico. Isto é também referido como um ensaio de inibição competitiva. Num ensaio de ligação competitiva representativo, o polipeptídeo CD40 marcado é precipitado por anticorpos candidatos numa amostra, por exemplo, em combinação com os anticorpos monoclonais criados contra um ou mais epítomos dos anticorpos monoclonais da invenção. Os anticorpos anti-CD40 que reagem especificamente com um epítopo de interesse podem ser identificados por rastreio de uma série de anticorpos preparados contra uma proteína CD40 ou o fragmento de proteína que compreende o epítopo particular da proteína CD40 de interesse. Por exemplo, para o CD40 humano, os epítomos de interesse incluem epítomos que compreendem resíduos lineares e/ou não-lineares de aminoácidos da isoforma curta do CD40 humano (ver nº de acesso GenBank NP_690593) apresentados na Figura 12B (SEQ

ID N°: 10), codificada pela sequência apresentada na Figura 12A (SEQ ID N°: 9, ver também acesso GenBank NM_152854), ou da isoforma longa do CD40 humano (ver n°s de acesso GenBank CAA43045 e NP_001241) apresentada na Figura 12D (SEQ ID N°: 12), codificada pela sequência apresentada na Figura 12C (SEQ ID N°: 11, ver n°s de Acesso GenBank X60592 e NM_001250). Em alternativa, os ensaios de ligação competitivos com anticorpos antagonistas anti-CD40 adequados previamente identificados podem ser utilizados para seleccionar os anticorpos monoclonais comparáveis aos anticorpos previamente identificados.

Os anticorpos utilizados em tais imunoensaios podem ser marcados ou não marcados. Os anticorpos não marcados podem ser utilizados em aglutinação; os anticorpos marcados podem ser utilizados numa grande variedade de ensaios, utilizando uma larga variedade de marcas. A detecção da formação de um complexo antigénio-anticorpo entre um anticorpo anti-CD40 e um epítipo de interesse pode ser facilitada, anexando uma substância detectável ao anticorpo. Meios de detecção adequados incluem a utilização de marcadores, tais como radionuclídeos, enzimas, coenzimas, substâncias fluorescentes, quimioluminescentes, cromogénios, substratos enzimáticos ou cofactores, inibidores de enzimas, complexos de grupos prostéticos, radicais livres, partículas, corantes e semelhantes. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou

ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente é o luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{115}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H . Tais reagentes marcados podem ser usados numa variedade de ensaios bem conhecidos, tais como radioimunoensaios, imunoensaios enzimáticos, por exemplo, ELISA, imunoensaios fluorescentes e similares. Ver, por exemplo, as Patentes US 3766162; 3791932; 3817837; e 4233402.

Qualquer um dos anticorpos antagonistas anti-CD40 anteriormente descritos ou fragmentos desse anticorpo podem ser conjugados antes da sua utilização nos métodos da presente invenção. Os métodos para produzir anticorpos conjugados são conhecidos na técnica. Assim, o anticorpo anti-CD40 pode ser marcado usando marcação indireta ou uma abordagem de marcação indireta. Por "marcação indireta" e "abordagem de marcação indireta" entende-se que um agente quelante é ligado covalentemente a um anticorpo e pelo menos um radionuclídeo é inserido no agente quelante. Ver, por exemplo, os agentes quelantes e os radionuclídeos descritos em Srivagtava e Mease (1991) Nucl. Med. Chem. Bio. 18:589-603. Os marcadores adequados incluem fluoróforos, cromóforos, átomos radioativos (particularmente ^{32}P e ^{125}I), reagentes densos em electrões, enzimas e ligandos possuindo parceiros de ligação específicos. As enzimas são tipicamente detectadas pela sua atividade. Por exemplo, a peroxidase de rábano é geralmente detectada pela sua capacidade de converter 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) num pigmento azul, quantificável com um espectrofotómetro. "Parceiro de ligação específico" refere-se a uma proteína capaz de se ligar a uma molécula de ligando com alta especificidade, tal como por exemplo no

caso de um antígeno e um anticorpo monoclonal específico. Outros parceiros de ligação específica incluem biotina e avidina ou estreptavidina, Ig G e proteína A e os inúmeros pares receptor-ligando conhecidos na técnica. Deve ser entendido que a descrição acima não pretende categorizar os vários marcadores em classes distintas, uma vez que o mesmo marcador pode servir em diversas modalidades diferentes. Por exemplo, o ^{125}I pode servir como marcador radioativo ou como um reagente denso em electrões. HRP pode servir como enzima ou como antígeno para um mAb. Além disso, pode-se combinar vários marcadores para o efeito desejado. Por exemplo, os mAbs e a avidina também necessitam de marcadores na prática da presente invenção: assim, pode-se marcar um mAb com biotina e detectar a sua presença com avidina marcada com ^{125}I , ou com um mAb anti-biotina marcado com HRP. Outras permutações e possibilidades serão facilmente evidentes para os peritos na técnica, e são consideradas como equivalentes dentro do âmbito da presente invenção.

Alternativamente, o anticorpo anti-CD40 pode ser marcado usando "marcação direta" ou uma "abordagem de marcação direta", em que um radionuclídeo está ligado de forma covalente diretamente a um anticorpo (tipicamente através de um resíduo de aminoácido). Radionuclídeos preferidos são fornecidos em Srivagtava e Mease (1991) *supra*. A abordagem de marcação indireta é particularmente preferida. Ver também, por exemplo, as Publicações Internacionais WO 00/52031 e WO 00/52473, em que um ligante é usado para ligar um marcador radioativo a anticorpos; e as formas marcadas de anticorpos anti-CD40 descritos na Patente US 6015542.

Além disso, um anticorpo (ou seu fragmento) pode ser conjugado com uma porção terapêutica tal como uma citotoxina, um agente terapêutico ou um ião de metal radioativo ou radioisótopo. Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial para as células. Os exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicin, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol e puomicina e seus análogos ou homólogos destes. Os agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, antimetabolitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por exemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (por exemplo, vincristina e vinblastina). Os radioisótopos incluem, mas não estão limitados a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, e outros semelhantes. Os conjugados da invenção podem ser utilizados para modificar uma dada resposta biológica; a molécula de fármaco não é para ser interpretada como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a porção de fármaco pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Essas proteínas podem

incluir, por exemplo, uma toxina tal como a abrina, rícina A, exotoxina de pseudomonas ou toxina da difteria; uma proteína tal como factor de necrose tumoral, interferão-alfa, interferão-beta, factor de crescimento do nervo, factor de crescimento derivado de plaquetas, ativador do tecido do plasminogénio, ou, modificadores da resposta biológica, tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colónias de granulócitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulador de colónias de granulócitos ("G-CSF"), ou outros factores de crescimento.

As técnicas para conjugação de tal fracção terapêutica para anticorpos são bem conhecidas. Ver, por exemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," em Controlled Drug Delivery, ed. Robinson et al. (2a ed, Marcel Dekker, Inc.), pp 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review", em Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Itália, 1985); "Analysis, Results and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", em Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp 303-316; e Thorpe et al. (1982) Immunol. Rev. 62:119-158.

Alternativamente, um anticorpo pode ser conjugado a um segundo anticorpo para formar um heteroconjugado de anticorpo, tal como descrito na Patente US 4676980. Além disso, os ligantes podem ser utilizados entre os marcadores e os anticorpos da invenção (ver Patente US 4831175). Os anticorpos ou, fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, podem ser diretamente marcados com iodo radioativo, índio, ítrio, ou outra partícula radioativa conhecida na técnica (Patente US 5595721). O tratamento pode consistir numa combinação de tratamento com anticorpos conjugados e não conjugados administrados simultaneamente ou subsequentemente (WO 00/52031 e WO 00/52473).

Variantes de anticorpos antagonistas anti-CD40

Variantes biologicamente ativas adequadas dos anticorpos antagonistas anti-CD40 podem ser utilizadas nos métodos da presente invenção. Tais variantes reter as propriedades de ligação desejadas do anticorpo antagonista anti-CD40 mãe. Os métodos para produzir as variantes de anticorpos estão geralmente disponíveis na técnica.

Por exemplo, variantes da sequência de aminoácidos de um anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 aqui descritos, podem ser preparados por mutações na sequência de ADN clonado que codifica para o anticorpo de interesse. Métodos de mutagenese e de alterações de sequências nucleotídicas são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor,

New York); Patente US 4873192, e as referências aí citadas. Orientação quanto a substituições de aminoácidos adequadas que não afectam a atividade biológica do polipeptídeo de interesse podem ser encontradas no modelo de Dayhoff et al. (1978) no Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, DC.). As substituições conservativas, tais como a troca de um aminoácido por outro com propriedades semelhantes, podem ser preferidas. Exemplos de substituições conservadoras incluem, mas não estão limitados a, Gly $\Leftrightarrow$ Ala, Val $\Leftrightarrow$ Ile $\Leftrightarrow$ Leu, Asp $\Leftrightarrow$ Glu, Lys $\Leftrightarrow$ Arg, Asn $\Leftrightarrow$ Gln, e Phe $\Leftrightarrow$ Trp $\Leftrightarrow$ Tyr.

Ao construir variantes polipeptídeo de interesse do anticorpo antagonista anti-CD40, as modificações são feitas de tal modo que as variantes continuem a possuir a atividade desejada, isto é, a afinidade de ligação semelhante e são capazes de se ligar especificamente a um antígeno CD40 humano expresso à superfície de uma célula humana, e ser isenta de atividade agonista significativa, mas exibir atividade antagonista quando ligados a um antígeno CD40 numa célula que expressa o CD40 humano. Obviamente, todas as mutações efectuadas no ADN que codifica o polipeptídeo variante não devem colocar a sequência fora do quadro de leitura e preferivelmente não criarão regiões complementares que possam produzir uma estrutura de mRNA secundária. Ver a Patente EP 75444.

Além disso, a região constante de um anticorpo antagonista anti-CD40, pode ser mutada para alterar a função efectora de uma série de maneiras. Por exemplo, ver a Patente US 6737056 B1 e a Publicação do Pedido de Patente US 2004/0132101A1, que descrevem mutações Fc que optimizam a ligação a receptores Fc do anticorpo.

De preferência, as variantes de um anticorpo antagonista anti-CD40 de referência têm sequências de aminoácidos que possuem pelo menos 70% ou 75% de identidade de sequência, de preferência pelo menos 80% ou 85% de identidade de sequência, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos para a molécula de anticorpo antagonista anti-CD40 de referência, por exemplo, o anticorpo 12 monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 descrito aqui, ou a uma porção menor da molécula de anticorpo de referência. Mais preferencialmente, as moléculas partilham pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência. Para os fins da presente invenção, a percentagem de identidade de sequência é determinada utilizando o algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman, utilizando uma pesquisa de lacuna afim com uma lacuna aberta de penalidade de 12 e uma lacuna de extensão de penalidade de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é ensinado em Smith e Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Uma variante pode, por exemplo, diferir do anticorpo antagonista anti-CD40 de referência, por tão poucos como 1 a 15 resíduos de aminoácidos, tal como, 1 a 10 resíduos de aminoácidos, como por exemplo 6-10, tão pouco como 5, tão pouco como 4, 3, 2, ou mesmo 1 resíduo de aminoácido.

No que diz respeito ao alinhamento óptimo das duas sequências de aminoácidos, o segmento contíguo da sequência de aminoácidos variante pode ter resíduos de aminoácidos adicionais ou resíduos de aminoácidos eliminados em relação à sequência de aminoácidos de referência. O segmento contíguo utilizado para comparação com a sequência de aminoácidos de referência irá incluir pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos e pode ser de 30, 40, 50

ou mais resíduos de aminoácidos. As correções para a identidade de sequência associada com substituições de resíduos conservadores ou lacunas podem ser feitas (ver algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman).

A estrutura química exata de um polipéptido capaz de se ligar especificamente a CD40 e reter a atividade antagonista, particularmente quando ligado ao antígeno CD40 nas células B malignas, depende de uma série de factores. Como os grupos amino e carboxilo ionizáveis estão presentes na molécula, um polipeptídeo particular pode ser obtido como um sal ácido ou básico, ou na forma neutra. Todas essas formulações que retêm a sua atividade biológica quando colocadas em condições ambientais adequadas estão incluídas na definição de anticorpos antagonistas anti-CD40 tal como aqui usada. Além disso, a sequência primária de aminoácidos do polipeptídeo pode ser aumentada por derivação utilizando partes de açúcar (glicosilação) ou por outras moléculas suplementares tais como lípidos, fosfato, grupos acetilo e semelhantes. Pode, também, ser aumentada por conjugação com sacarídeos. Certos aspectos de tal aumento são conseguidos através de sistemas de processamento pós-tradução do hospedeiro produzido; outras modificações podem ser introduzidas *in vitro*. Em qualquer dos casos, essas 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 essas modificações possam afectar quantitativamente ou qualitativamente a atividade, quer aumentando ou diminuindo a atividade do polipeptídeo, nos diversos ensaios. Além disso, os resíduos de aminoácidos individuais na cadeia podem ser modificados por oxidação, redução, ou outra derivatização, e o polipeptídeo pode ser

clivado para se obter fragmentos que retêm a atividade. Tais alterações que não destruam a atividade antagonista não removem a sequência de polipeptídeo a partir da definição dos anticorpos anti-CD40 de interesse, tal como aqui utilizada.

A técnica proporciona orientação substancial sobre a preparação e utilização das variantes de polipeptídeos. Ao preparar as variantes de anticorpos anti-CD40, um perito na técnica pode facilmente determinar quais as modificações da sequência de nucleotídeo da proteína nativa ou aminoácido que irão resultar numa variante que é adequada para uso como um componente terapeuticamente ativo de uma composição farmacêutica utilizada nos métodos aqui revelados

Métodos de tratamento utilizando os anticorpos antagonistas anti-CD40

Os métodos aqui descritos são dirigidos para o uso de anticorpos antagonistas anti-CD40 para o tratamento de pacientes que tenham uma doença mediada pela estimulação da sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Por "célula que expressa CD40" entende-se células B normais e malignas que expressam o antigénio CD40. Os métodos para detectar a expressão de CD40 em células são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitadas a, técnicas de PCR, imuno-histoquímica, citometria de fluxo, Western blot, ELISA e semelhantes. Por célula B "maligna" entende-se qualquer célula B neoplástica, incluindo, mas não limitado a células B derivadas de linfomas, incluindo linfomas de células B de baixo, intermédio e alto grau, linfomas imunoblásticos, linfomas não-Hodgkin, doença de Hodgkin, linfomas induzidos de Epstein-Barr (EBV) e linfomas relacionadas com a SIDA, bem como leucemia

linfoblástica aguda de células B, mielomas, leucemias linfocíticas crónicas, leucemia mieloblástica aguda, e semelhantes.

"Tratamento" é aqui definido como a aplicação ou a administração de um antagonista do anticorpo anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos a um paciente, ou a aplicação ou administração de um antagonista do anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento a um tecido isolado ou linha celular de um paciente, em que o paciente tem uma doença, um sintoma de uma doença ou uma predisposição para uma doença, em que o objectivo é o de curar, sarar, atenuar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, melhorar ou afectar a doença, o sintoma da doença ou a predisposição para a doença. Por "tratamento" entende-se também a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo os anticorpos antagonistas anti-CD40 ou os seus fragmentos a um paciente, ou a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo os anticorpos anti-CD40 ou os seus fragmentos a um tecido isolado ou uma linha celular de um paciente, que sofre de uma doença, um sintoma de uma doença ou uma predisposição para uma doença, em que o objectivo é o de curar, sarar, atenuar, aliviar, alterar, remediar, melhorar, melhorar ou afectar a doença, os sintomas da doença, ou a predisposição para a doença.

Por "atividade anti-tumoral" entende-se uma redução na taxa de proliferação ou a acumulação de células malignas que expressam o CD40, e portanto uma diminuição na taxa de crescimento de um tumor existente ou de um tumor que surge durante a terapia, e/ou a destruição de células neoplásicas existentes (tumores) ou células neoplásicas recém-formadas,

e, conseqüentemente, uma diminuição no tamanho total de um tumor durante a terapia. A terapia com pelo menos um anticorpo anti-CD40 (ou um seu fragmento de ligação ao antígeno) causa uma resposta fisiológica que é benéfica no que diz respeito ao tratamento de estados de doença associados com a estimulação da sinalização de CD40 nas células que expressam CD40 num ser humano.

Os métodos aqui descritos encontram utilidade no tratamento de linfomas não-Hodgkin relacionados com a proliferação de células B anormal, incontrollável, ou acumulação. Para fins da presente divulgação, estes linfomas serão referidos de acordo com o esquema de classificação *Working Formulation*, ou seja, os linfomas de células B classificados como de baixo grau, de grau intermédio e de alto grau (ver "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project" Cancer 49 (1982):2112-2135). Assim, os linfomas de células B de baixo grau incluem pequenos linfócitos, células pequenas clivadas foliculares e linfomas mistos de células pequenas clivadas foliculares e grandes; linfomas de grau intermédio incluem células grandes foliculares, células pequenas clivadas difusas, mistura de células pequenas e grandes difusas, e linfomas de células grandes difusas; e os linfomas de alto grau incluem grandes células imunoblásticas, linfoblástica e linfomas de células pequenas não clivadas do tipo Burkitt e não Burkitt.

Reconhece-se que os métodos aqui descritos são úteis no tratamento terapêutico de linfomas de células B, que são classificados de acordo com o sistema da Revised European and American Lymphoma Classification (REAL). Tais linfomas de células B incluem, mas não estão limitados a, linfomas classificados como neoplasias de células B precursoras,

tais como leucemia linfoblástica B/linfoma; neoplasias de células B periféricas, incluindo a leucemia linfocítica crônica de células B/ pequenos linfomas linfocíticos, linfoma linfoplasmacitóide/imunocitoma, linfoma de manto de células (MCL), linfoma de centro folicular (folicular) (incluindo pequenas células difusas, mistura de pequenas e grandes células difusas e linfomas de células grandes difusas), linfoma de células B da zona marginal (incluindo tipos do baço extranodal e nodal), leucemia das células pilosas, plasmocitoma/mieloma, linfoma de células B grandes difusas do subtipo mediastinal primário (timo), linfoma de Burkitt e linfoma de células B de alto grau do tipo Burkitt; leucemias agudas; leucemia linfocítica aguda; leucemia mieloblástica; leucemia mielóide aguda; leucemia promielocítica; leucemia mielomonocítica; leucemia monocítica; eritroleucemia; leucemia granulocítica (leucemia mielóide crônica); leucemia linfocítica crônica; policitemia vera; mieloma múltiplo; macroglobulinemia de Waldenstrom; doença de cadeia pesada; e linfomas de células B de baixo grau ou alto grau inclassificáveis.

Reconhece-se que os métodos aqui revelados podem ser úteis na prevenção de novas excrescências que surjam durante a terapia. Os métodos aqui descritos são particularmente úteis no tratamento de indivíduos com linfomas de células B de baixo grau, particularmente aqueles sujeitos com recaídas após a quimioterapia padrão. Linfomas de células B de baixo grau são mais indolentes do que os linfomas de células B intermédios e de alto grau e são caracterizados por um curso de surto/remissão. Assim, o tratamento destes linfomas é melhorado utilizando os métodos aqui divulgados, onde os episódios de recorrência são reduzidos em número e intensidade.

Os antagonistas de anticorpos anti-CD40 aqui descritos podem também encontrar utilização no tratamento de doenças inflamatórias, e deficiências ou desordens do sistema imunitário, incluindo, mas não limitado a, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, esclerodermia, síndrome CREST, miosite inflamatória, síndrome de Sjogren, doença mista do tecido conjuntivo, artrite reumatoide, esclerose múltipla, doença inflamatória do intestino, síndrome de angústia respiratória aguda, inflamação pulmonar, fibrose pulmonar idiopática, osteoporose, hipersensibilidade do tipo retardado, asma, cirrose biliar primária e púrpura trombocitopénica idiopática.

De acordo com os métodos aqui descritos, pelo menos um anticorpo antagonista anti-CD40 (ou um fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos), tal como definido aqui noutra sítio é usado para promover uma resposta terapêutica positiva com respeito a uma célula B humana maligna. Por "resposta terapêutica positiva" no que diz respeito ao tratamento do cancro entende-se uma melhoria da doença em associação com a atividade anti-tumoral destes anticorpos ou os seus fragmentos, e/ou uma melhoria dos sintomas associados com a doença. Isto é, um efeito anti-proliferativo, a prevenção de mais excrescências tumorais, uma redução do tamanho do tumor, uma redução do número de células cancerosas e/ou uma diminuição de um ou mais sintomas mediados pela estimulação das células que expressam CD40 possa ser observado. Assim, por exemplo, uma melhoria da doença pode ser caracterizada como uma resposta completa. Por "resposta completa" entende-se a ausência de doença clinicamente detectável com a normalização de todos os estudos radiográficos anteriormente anormais, medula óssea e líquido

cefalorraquidiano (LCR). Tal resposta deve persistir durante pelo menos um mês após o tratamento de acordo com os métodos aqui descritos. Alternativamente, uma melhoria da doença pode ser classificada como sendo uma resposta parcial. Por "resposta parcial" entende-se, pelo menos, cerca de uma redução de 50% em todas as cargas tumoral mensuráveis (isto é, o número de células tumorais presentes no sujeito), na ausência de novas lesões e persistência durante pelo menos um mês. Tal resposta é aplicável apenas a tumores mensuráveis.

A resposta do tumor pode ser avaliada por alterações na morfologia do tumor (isto é, carga tumoral total, tamanho do tumor, e afins), utilizando técnicas de rastreamento, tais como ressonância magnética (MRI), imagiologia radiográfica, tomografia computadorizada (TC), imagiologia bioluminescente, por exemplo, a imagem da luciferase, análise de imagem do osso, e recolha de amostras de biópsia do tumor, incluindo o aspirado de medula óssea (BMA). Além destas respostas terapêuticas positivas, o sujeito sob a terapia com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o seu fragmento de ligação ao antígeno pode ter o efeito benéfico de uma melhoria dos sintomas associados com a doença. Assim, para os tumores de células B, o sujeito pode experimentar uma diminuição dos chamados sintomas B, ou seja, suores noturnos, febre, perda de peso e/ou urticária.

Por "dose ou quantidade terapêuticamente eficaz" ou "quantidade eficaz" entende-se uma quantidade de anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que, quando administrada provoca uma resposta terapêutica positiva com respeito ao tratamento de

um paciente com uma doença que compreende a estimulação de células que expressam CD40. Em algumas formas de realização da invenção, uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD40 ou o seu fragmento é na gama a partir de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, desde cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg ou desde cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. É reconhecido que o método de tratamento pode compreender uma única administração de uma dose terapeuticamente eficaz ou administrações múltiplas de uma dose terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos.

Uma outra forma de realização da divulgação é o uso de anticorpos antagonistas anti-CD40 para a monitorização do diagnóstico dos níveis de proteína em tecido como parte de um procedimento de ensaio clínico, por exemplo, para determinar a eficácia de um determinado regime de tratamento. A detecção pode ser facilitada pelo acoplamento do anticorpo a uma substância detectável. Exemplos de substâncias detectáveis incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato

de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui o 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 .

Os anticorpos anti-CD40 aqui descritos podem ainda ser usados para fornecer reagentes, por exemplo, anticorpos marcados que podem ser utilizados, por exemplo, para identificar as células que expressam o CD40. Isto pode ser muito útil para determinar o tipo de célula de uma amostra desconhecida. Painéis de anticorpos monoclonais podem ser utilizados para identificar tecidos por espécie e/ou tipo de órgão. De um modo semelhante, esses anticorpos anti-CD40 podem ser usados para rastrear células de cultura de tecido para a contaminação (por exemplo, rastrear a presença de uma mistura de células que expressam CD40 e que não expressam CD40 numa cultura).

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 podem ser usados em combinação com agentes quimioterapêuticos conhecidos e citocinas para o tratamento de estados de doença que compreende células estimuladas que expressam CD40. Por exemplo, os anticorpos anti-CD40 da invenção podem ser utilizados em combinação com citocinas, tais como interleucina-2. Numa outra forma de realização, os anticorpos anti-CD40 da invenção podem ser utilizados em combinação com rituximab (IDEC-C2B8; Rituxan®; IDEC Pharmaceuticals Corp, San Diego, Califórnia).

Deste modo, os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, ou fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos, são administrados em combinação com pelo menos uma outra terapia de cancro, incluindo, mas não se limitando a, cirurgia ou procedimentos de cirurgia (por exemplo, esplenectomia, hepatectomia, linfadenectomia, leucoforese, transplante de medula óssea, e semelhantes); terapia de radiação; quimioterapia, opcionalmente em combinação com transplante de medula óssea autóloga, em que os agentes quimioterapêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a, fludarabina ou fosfato de fludarabina, clorambucil, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona e combinações dos mesmos, por exemplo, regimes contendo antraciclinas como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mais doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina, dexametasona), MP (melfalano e prednisona), e outros agentes citotóxicos e/ou terapêutico utilizados em quimioterapia, tais como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginase, e antimetabolitos, incluindo, mas não limitados a, citarabina, metotrexato, 5-fluorouracil decarbazina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina e nelarabina; outra terapia anti-cancro de anticorpo monoclonal (por exemplo, alemtuzumab (Campath[®]) ou outro anticorpo anti-CD52 visando a glicoproteína de superfície celular CD52 em células B malignas, rituximabe (Rituxan[®]), o anticorpo inteiramente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar[®]), ibritumomab tiuxetan (Zevalin[®]), ou qualquer outro terapêutico anti-CD20 visando o antigénio CD20 nas células B malignas; anticorpo anti-CD19 (por exemplo, MT103, um anticorpo biespecífico); anticorpo anti-CD22 (por

exemplo, o anticorpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) ou outros anticorpo anti-cancro visando o factor de crescimento endotelial vascular humano; anticorpo anti-CD22 visando o antígeno CD22 nas células B malignas (por exemplo, o anticorpo monoclonal BL-22, uma toxina α CD22); o anticorpo α -M-CSF visando o factor estimulante de colónias de macrófagos; anticorpos que visam o receptor ativador do factor nuclear-kappaB (RANK) e o seu ligando (RANKIL), que são sobre-expressos em mieloma múltiplo; o anticorpo anti-CD23 visando o antígeno CD23 nas células B malignas (por exemplo, IDEC-152); o anticorpo anti-CD80 visando o antígeno CD80 (por exemplo, IDEC-114); anticorpo anti-CD38, visando o antígeno CD38 nas células B malignas; anticorpos visando o complexo principal de receptores da classe II de histocompatibilidade (anticorpos anti-MHC) expressos em células B malignas; outros anticorpos anti-CD40 (por exemplo, SGN-40), tendo o antígeno CD40 nas células B malignas; e anticorpos de visando o ligando de receptores 1 da necrose tumoral indutora de apoptose (TRAIL-R1) (por exemplo, o anticorpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1), e TRAIL-R2, expressa num número de tumores sólidos e de tumores de origem hematopoiética); terapia do cancro baseada em moléculas pequenas, incluindo, mas não limitado a, inibidores de microtúbulos e/ou da topoisomerase (por exemplo, o inibidor mitótico de dolastatina e análogos de dolastatina; agente de ligação à tubulina T900607; XL119; e o inibidor da topoisomerase aminocamptotecina), SDX-105 (cloridrato de bendamustina), ixabepilona (um análogo de epotilona, também conhecido como BMS-247550), inibidores da proteína quinase C, por exemplo, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoílestaurosporina), pixantrona, eloxatin (um agente antineoplásico), ganite (nitrato de gálio), Thalomid® (talidomida), imunomoduladores derivados da talidomida (por

exemplo, revlimid (anteriormente revimid)) Affinitak™ (inibidor antessentido da proteína quinase C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, induzindo a apoptose dos linfócitos malignos) análogos de nucleósidos de purina de segunda geração, tais como, clofarabina, inibidores da produção da proteína Bcl-2 por células cancerosas (por exemplo, os agentes antessentido oblimersen e Genasense®), inibidores de proteassoma (por exemplo, Velcade™ (bortezomib), inibidores de quinase de moléculas pequenas (por exemplo, CHIR-258), inibidores de VEGF de moléculas pequenas) (por exemplo, ZD-6474), inibidores de pequenas moléculas da proteína de choque térmico (HSP) 90 (por exemplo, 17-AAG), inibidores de moléculas pequenas de desacetilases de histona (por exemplo, agentes de citodiferenciação híbridos/polares HPC) tais como ácido suberanilohidroxâmico (SAHA), e FR- 901228) e agentes apoptóticos como Trisenox® (trióxido de arsénio) e Xcytrin® (motexafin gadolínio); terapias contra o cancro baseadas em vacina/imunoterapia, incluindo, mas não limitado a, abordagens da vacina (por exemplo, Id-KLH, Oncophage, vitaletine), imunoterapia personalizada ou imunoterapia idiotípica ativa (por exemplo, imunoterapia personalizada MyVax®, formalmente designado GTP-99), ProMune® (CPG 7909, um agonista sintético para o tipo de receptor 9 (TLR9)), terapia de interferão-alfa, terapia com interleucina-2 (IL-2), terapia com IL-12, terapia com IL-15, e terapia com IL-21; terapia de esteroides; ou outra terapia de cancro; em que a terapia do cancro adicional é administrada antes, durante, ou subsequentemente à terapia com anticorpos antagonistas anti-CD40. Assim, quando as terapias combinadas compreendem a administração de um antagonista do anticorpo anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, em combinação com a administração de um outro agente terapêutico, tal como a quimioterapia, radioterapia, outra terapia de anticorpos

anti-cancro, a terapia de cancro com base em pequenas moléculas, ou terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia, os métodos aqui descritos abrangem coadministração, utilizando formulações separadas ou uma única formulação farmacêutica, e administração consecutiva ou em qualquer ordem. Onde os métodos aqui descritos compreendem regimes terapêuticos combinados, estas terapias podem ser administradas simultaneamente, isto é, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado concomitantemente ou na mesma moldura de tempo que a outra terapia do cancro (ou seja, as terapias vão em simultâneo, mas o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos não é administrado precisamente ao mesmo tempo que a outra terapia de cancro). Alternativamente, o anticorpo antagonista anti-CD40 da presente invenção ou um seu fragmento de ligação ao antígeno também podem ser administrados antes ou depois da outra terapia do cancro. A administração sequencial das diferentes terapias do cancro pode ser realizada independentemente do sujeito tratado responder ao primeiro curso de terapia para reduzir a possibilidade de remissão ou recaída. Quando as terapias combinadas compreendem a administração do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em combinação com a administração de um agente citotóxico, o fragmento de anticorpo antagonista anti-CD40 ou de ligação ao antígeno, do mesmo é de preferência administrado antes da administração do agente citotóxico.

Em algumas formas de realização da invenção, os anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, são administrados em

combinação com quimioterapia, e opcionalmente em combinação com transplante autólogo de medula óssea, em que o anticorpo e o agente quimioterapêutico podem ser administrados sequencialmente, em qualquer ordem, ou simultaneamente (isto é, simultaneamente ou dentro de um mesmo período de tempo). Exemplos de agentes quimioterapêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a, fludarabina ou fosfato de fludarabina, clorambucil, vincristina, pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona e combinações destes, por exemplo, regimes contendo antraciclinas como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mais doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina e dexametasona), MP (melfalano e prednisona), e outros agentes citotóxicos e/ou terapêuticos utilizados em quimioterapia, tais como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginase e antimetabolitos, incluindo, mas não limitados a, citarabina, metotrexato, decarbazina 5-fluorouracil, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina e nelarabina. Em algumas concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrada antes do tratamento com o agente quimioterapêutico. Em concretizações alternativas, o anticorpo antagonista anti-CD40 for administrado após o tratamento com o agente quimioterapêutico. Ainda noutras formas de realização, o agente quimioterapêutico é administrado em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Assim, por exemplo, em algumas formas de realização, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado em combinação com fludarabina ou fosfato de fludarabina. Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração de fludarabina ou fosfato de fludarabina. Em concretizações alternativas, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com fludarabina ou fosfato de fludarabina. Ainda noutras formas de realização, a fludarabina ou fosfato de fludarabina é administrado em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Em outras formas de realização da invenção, o clorambucil, um fármaco de alquilação, é administrado em combinação com um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração do clorambucil. Em concretizações alternativas, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com clorambucil. Ainda noutras formas de realização, o clorambucil é administrado em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Ainda noutras formas de realização, os regimes contendo antraciclina como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona) e CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mais doxorubicina) podem ser combinados com a administração de um antagonista do anticorpo anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração de regimes contendo antraciclina. Em outras concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com os regimes contendo antraciclina. Ainda noutras formas de realização, o regime contendo antraciclina é administrado em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Em concretizações alternativas, um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, é administrado em combinação com alemtuzumab (Campath®; distribuído por Berlex Laboratories, Richmond, Califórnia). O alemtuzumab é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante (Campath-1H) que tem como alvo o antígeno CD52, expresso em células B malignas. Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração de alemtuzumab. Em outras concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com alemtuzumab. Ainda noutras formas de realização, o alemtuzumab é administrado em simultâneo com

o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Em concretizações alternativas, um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, é administrado em combinação com um anticorpo anti-CD20 terapêutico visando o antígeno CD20 nas células B malignas, por exemplo, rituximab (Rituxan®), o anticorpo inteiramente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ou ibritumomab tiuxetan (Zevalin®). Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração do anticorpo anti-CD20. Em outras concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com o anticorpo anti-CD20. Ainda noutras concretizações, o anticorpo anti-CD20 é administrado em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Em concretizações alternativas, um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, é administrado em combinação com uma terapia do cancro baseada em pequenas moléculas, incluindo, mas não se limitando a, inibidores de microtúbulos 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 da topoisomerase aminocamptotecina), SDX-105 (cloridrato de

bendamustina), ixabepilona (um epotilona análogo, também referido como BMS-247550), inibidores da proteína quinase C, por exemplo, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoílestaurosporina), pixantrona, eloxatin (um agente antineoplásico), ganite (nitrito de gálio), Thalomid® (talidomida), derivados imunomoduladores da talidomida (por exemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inibidor antessentido da proteína quinase C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, induzindo a apoptose dos linfócitos malignos), análogos de nucleósidos de purina de segunda geração tais como clofarabina, inibidores da produção da proteína Bcl-2 por células cancerosas (por exemplo, os agentes antessentido oblimersen e Genasense®), inibidores de quinase de moléculas pequenas, inibidores de proteassoma (por exemplo, Velcade™ (bortezomib)), (por exemplo, CHIR-258), inibidores de VEGF de moléculas pequenas (por exemplo, ZD-6474), inibidores de pequenas moléculas da proteína de choque térmico (HSP) 90 (por exemplo, 17-AAG), inibidores de moléculas pequenas de desacetilases de histona (por exemplo, agentes de citodiferenciação híbridos/polares HPC) como ácido suberanilohidroxâmico (SAHA) e FR-901228) e agentes apoptóticos como Trisenox® (trióxido de arsénio) e Xcytrin® (motexafin gadolínio). Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração da terapia do cancro baseada em molécula pequena. Em outras concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com a terapia do cancro baseada em molécula pequena. Ainda noutras formas de realização, a terapia do cancro baseada em pequena molécula é administrada em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Ainda noutras formas de realização, um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, pode ser utilizado em combinação com a terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia, incluindo, mas não limitado a, as abordagens da vacina (por exemplo, Id-KLH, Oncophage, vitalethine), imunoterapia personalizada ou imunoterapia idiotípica ativa (por exemplo, imunoterapia personalizada MyVax[®], formalmente designado GTOP-99), ProMune[®] (CPG 7909, um agonista sintético para o tipo de receptor 9 (TLR9)), terapia com interferão-alfa, terapia com interleucina-2 (IL-2), terapia com IL-12, terapia com IL-15, ou terapia com IL-21, ou terapia com esteroides. Numa tal concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado antes da administração da terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia. Em outras concretizações, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é administrado após o tratamento com a terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia. Ainda noutras formas de realização, a terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia é administrada em simultâneo com o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos.

Numa tal forma de realização, um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, pode ser usado em combinação com a IL-2. IL-2, um agente conhecido para aumentar o número de células efectoras assassinas naturais

(NK) em pacientes tratados, pode ser administrado antes de, ou concomitantemente com, o anticorpo antagonista anti-CD40 da invenção, ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. Este número expandido de células efectoras NK pode levar a uma maior atividade de ADCC do anticorpo antagonista anti-CD40 administrado ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. Em outras formas de realização, a IL-21 serve como o agente imunoterapêutico para estimular a atividade das células NK quando administrada em combinação com um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um seu fragmento de ligação ao antígeno.

Além disso, a terapia de combinação com dois ou mais agentes terapêuticos e um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descritos podem também ser usados para o tratamento de estados de doença compreendendo a estimulação de células que expressam CD40, por exemplo, câncros relacionados com as células B, e distúrbios autoimunes e/ou inflamatórios. Sem ser limitante, os exemplos incluem a terapia de combinação tripla, em que dois agentes quimioterapêuticos são administrados em combinação com um anticorpo antagonista anti-CD40 aqui descrito, e em que um agente quimioterapêutico e um outro anticorpo monoclonal anti-câncer (por exemplo, alemtuzumab, rituximab, ou anticorpo anti-CD23) são administrados em combinação com um anticorpo antagonista de anti-CD40 aqui descrito. Exemplos de tais combinações incluem, mas não estão limitados a, combinações de fludarabina, ciclofosfamida e o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um seu fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos; e combinações de fludarabina, um anticorpo anti-CD20, por exemplo, rituximab (Rituxan®; IDEC

Pharmaceuticals Corp, San Diego, Califórnia), e o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um fragmento de ligação ao antigénio do mesmo.

Formulações farmacêuticas e modos de administração

Os anticorpos antagonistas de anti-CD40 da presente invenção são administrados numa concentração que é terapeuticamente eficaz para prevenir ou tratar doenças mediadas por células que expressam CD40, tais como LES, CBP, PTI, esclerose múltipla, psoríase, doença de Crohn, rejeição de enxerto, e linfoma de célula B. Para alcançar este objectivo, os anticorpos podem ser formulados usando uma variedade de excipientes aceites conhecidos na técnica. Tipicamente, os anticorpos são administrados por injeção, tanto por via intravenosa ou intraperitoneal. Métodos para conseguir esta administração são conhecidos dos vulgares peritos na técnica. Pode também ser possível obter composições que poderão ser administradas por via tópica ou oral, ou que podem ser capazes de transmissão através de membranas mucosas.

A administração intravenosa ocorre preferencialmente por infusão ao longo de um período de cerca de 1 a cerca de 10 horas, mais preferencialmente durante cerca de 1 a cerca de 8 horas, ainda mais preferencialmente durante cerca de 2 a cerca de 7 horas, ainda mais preferencialmente durante cerca de 4 a cerca de 6 horas, dependendo onde o anticorpo anti-CD40 está a ser administrado. A perfusão inicial com a composição farmacêutica pode ser administrada durante um período de cerca de 4 a cerca de 6 horas, com infusões subsequentes entregues mais rapidamente. Infusões

subsequentes podem ser administradas ao longo de um período de cerca de 1 a cerca de 6 horas, incluindo, por exemplo, cerca de 1 a cerca de 4 horas, de cerca de 1 a cerca de 3 horas, ou cerca de 1 a cerca de 2 horas.

Uma composição farmacêutica da invenção é formulada para ser compatível com a sua via de administração pretendida. Exemplos de possíveis vias de administração parentérica incluem, (por exemplo, por via intravenosa (IV), intramuscular (IM), intradérmica, subcutânea (SC), ou infusão), oral e pulmonar (por exemplo, por inalação), nasal, transdérmica (tópica), transmucosa e administração rectal. As soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parentérica, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietilenoglicóis, glicerina, propilenoglicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos, tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; agentes quelantes tais como ácido etilenodiaminotetracético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajustamento da tonicidade tais como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parentérica pode ser encerrada em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico.

Os anticorpos anti-CD40 são tipicamente fornecidos pela técnica padrão, com uma solução tampão farmacêuticamente aceitável, por exemplo, solução salina estéril, água tamponada, propilenoglicol, combinações dos anteriores,

etc. Métodos estéreis para a preparação de agentes administráveis parentericamente são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences (18 ed;. Mack Publishing Company, Eaton, Pensilvânia, 1990). Ver também, por exemplo, a WO 98/56418, que descreve formulações farmacêuticas estabilizadas de anticorpos adequadas para utilização nos métodos aqui descritos.

A quantidade de, pelo menos, um anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento a ser administrados é prontamente determinado por um vulgar perito na técnica sem experimentação indevida. Os factores que influenciam o modo de administração e a quantidade respectiva de pelo menos um anticorpo antagonista anti-CD40 (ou um seu fragmento) incluem, mas não estão limitados a, severidade da doença, história natural da doença, idade, altura, peso, saúde e condição física do indivíduo que esteja sujeito à terapia. Da mesma forma, a quantidade de anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento a ser administrado irá ser dependente do modo de administração e se o sujeito irá sofrer uma dose única ou múltiplas doses do presente agente anti-tumoral. Geralmente, uma dosagem mais elevada de anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento é preferido com o aumento do peso do sujeito submetida a terapia. A dose de anticorpo anti-CD40 ou seu fragmento a ser administrado está na gama de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de preferência no intervalo de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg. Assim, por exemplo, a dose pode ser de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, ou 50 mg/kg.

Noutra modalidade da divulgação, o método compreende a administração de doses múltiplas de anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento. O método pode compreender a administração de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, ou mais doses terapeuticamente eficazes de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo antagonista anti-CD40 ou um seu fragmento. A frequência e duração da administração de doses múltiplas das composições farmacêuticas compreendendo o anticorpo anti-CD40 ou um seu fragmento pode ser facilmente determinada por um perito na técnica sem experimentação indevida. Além disso, o tratamento de um sujeito com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo pode incluir um tratamento único ou, preferencialmente, pode incluir uma série de tratamentos. Num exemplo preferido, um sujeito é tratado com anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo na gama de entre cerca de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, uma vez por semana durante entre cerca de 1 a 10 semanas, de preferência entre cerca 2 a 8 semanas, mais preferencialmente entre cerca de 3 a 7 semanas, e ainda mais preferencialmente durante cerca de 4, 5, ou 6 semanas. O tratamento pode ocorrer anualmente para prevenir a recaída ou a indicação de recaída. Será também apreciado que a dosagem eficaz de anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo utilizado para o tratamento pode aumentar ou diminuir ao longo do curso de um tratamento em particular. As alterações na dosagem podem resultar e tornar-se aparentes a partir dos resultados de ensaios de diagnóstico, tal como aqui descrito.

Assim, numa forma de realização, o regime de dosagem inclui uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou um seu

fragmento, nos dias 1, 7, 14, e 21 de um período de tratamento. Numa outra forma de realização, o regime de dosagem inclui uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou um seu fragmento, nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 de uma semana num período de tratamento. Outras formas de realização incluem um regime de dosagem com uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou um seu fragmento, nos dias 1, 3, 5 e 7 de uma semana num período de tratamento, um regime de dosagem incluindo uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo anti-CD40 ou um seu fragmento, nos dias 1 e 3 de uma semana num período de tratamento, e um regime de dosagem preferido incluindo uma primeira administração de uma dose terapeuticamente eficaz de pelo menos um anti-CD40 ou um seu fragmento de anticorpo no dia 1 de uma semana num período de tratamento. O período de tratamento pode compreender 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, um mês, 3 meses, 6 meses, ou um ano. Os períodos de tratamento podem subsequentes ou ser separados uns dos outros por um dia, uma semana, duas semanas, um mês, 3 meses, 6 meses, ou um ano.

Em algumas formas de realização, as doses terapeuticamente eficazes de anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo varia de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, desde cerca de 3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, entre cerca

de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, desde cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, ou entre cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg / kg. Assim, por exemplo, a dose de qualquer fragmento de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou de ligação ao antígeno dos mesmos, por exemplo, o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, pode ser de 0,003 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg, 45 mg/kg, 50 mg/kg, ou outras tais doses que caem dentro do intervalo de cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 50 mg/kg. A mesma dose terapêuticamente eficaz de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser administrada ao longo de cada semana de dosagem de anticorpo. Alternativamente, as doses terapêuticamente eficazes diferentes de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento de ligação ao antígeno podem ser utilizados ao longo de um período de tratamento.

Em outras formas de realização, a dose terapêuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tal como definido aqui noutro sítio pode estar no intervalo de dosagem mais baixa (ou seja, cerca de 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg), com as doses subsequente caindo dentro da gama de dosagem mais elevada (isto é, desde cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg).

Em concretizações alternativas, a dose terapêuticamente eficaz inicial de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, tal como

definido aqui noutro sítio pode estar na gama de dosagem superior (isto é, cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg), com as doses subseqüente caindo dentro da gama de dosagem mais baixa (ou seja, 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg). Assim, numa forma de realização, a dose terapeuticamente eficaz inicial do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é de cerca de 20 mg/kg a cerca de 35 mg/kg, incluindo cerca de 20 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 30 mg/kg, e cerca de 35 mg/kg, e as doses terapeuticamente eficazes subseqüentes do anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento de ligação ao antigénio são cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, incluindo cerca de 5 mg/kg, 8 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, e cerca de 15 mg/kg.

Em algumas concretizações da invenção, a terapia de anticorpo antagonista anti-CD40 é iniciada pela administração de uma "dose de carga" do anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos ao sujeito com necessidade de terapia do anticorpo antagonista anti-CD40. Por "dose de carga" entende-se uma dose inicial de anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo que é administrada ao indivíduo, em que a dose do anticorpo, ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, administrada cai dentro do intervalo de dosagem mais elevada (isto é, desde cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg). A "dose de carga" pode ser administrada na forma de uma única administração, por exemplo, uma única infusão, onde o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é administrado por via intravenosa, ou como administrações múltiplas, por exemplo, infusões múltiplas, onde o anticorpo ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo é administrado por via

intravenosa, enquanto a "dose de carga" completa é administrada dentro de cerca de um período de 24 horas. Após a administração da "dose de carga", ao sujeito é então administrada uma ou mais doses terapeuticamente eficazes adicionais do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. As doses terapeuticamente eficazes subsequentes podem ser administradas, por exemplo, de acordo com um calendário de dosagem semanal, ou uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, ou uma vez a cada quatro semanas. Em tais formas de realização, as doses terapeuticamente eficazes subsequentes geralmente caem dentro do intervalo de dosagem mais baixa (ou seja, 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg).

Alternativamente, em algumas formas de realização, a seguir à "dose de carga", as doses terapeuticamente eficazes subsequentes do anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento de ligação ao antígeno são administradas de acordo com um "programa de manutenção", em que a dose terapeuticamente eficaz do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é administrada uma vez por mês, uma vez a cada seis 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 sete meses, uma vez a cada oito meses, uma vez a cada nove meses, uma vez a cada 10 meses, uma vez a cada 11 meses, ou uma vez a cada 12 meses. Em tais formas de realização, as doses terapeuticamente eficazes do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo caem dentro da gama de

dosagem mais baixa (ou seja, 0,003 mg/kg a cerca de 20 mg/kg), particularmente quando as doses subsequentes são administradas a intervalos mais frequentes, por exemplo, uma vez a cada duas semanas, uma vez por mês, ou dentro do intervalo de dosagem mais elevada (isto é, desde cerca de 20 mg/kg a cerca de 50 mg/kg), particularmente quando as doses subsequentes são administradas a intervalos menos frequentes, por exemplo, quando as doses subsequentes são administradas com cerca de um mês até cerca de 12 meses de intervalo.

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 presentes nas composições farmacêuticas aqui descritas, para utilização nos métodos aqui descritos podem ser nativos ou obtidos por técnicas recombinantes, e podem ser de qualquer fonte, incluindo fontes de mamíferos, tais como, por exemplo, ratinho, rato, coelho, primata, porco e humano. De preferência, tais polipeptídeos são derivados de uma fonte humana, e mais preferencialmente, são proteínas humanas recombinantes a partir de linhas celulares de hibridoma.

As composições farmacêuticas úteis nos métodos aqui descritos podem compreender variantes biologicamente ativas dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção. Tais variantes devem reter a atividade biológica desejada do polipeptídeo nativo de tal modo que a composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo variante possua o mesmo efeito terapêutico que a composição farmacêutica compreendendo o polipeptídeo nativo quando administrada a um sujeito. Isto é, a variante de anticorpo anti-CD40, irá servir como um componente terapeuticamente ativo na composição farmacêutica de um modo similar ao observado para o anticorpo antagonista nativo, por exemplo CHIR-5.9

ou CHIR-12.12, como está expresso pela linha celular de hibridoma 5.9 ou 12.12, respectivamente. Estão disponíveis métodos na técnica para determinar se um anticorpo variante anti-CD40 retém a atividade biológica desejada, e, portanto, serve como um componente terapeuticamente ativo na composição farmacêutica. A atividade biológica das variantes de anticorpos pode ser medida usando ensaios especificamente concebidos para a medição da atividade do anticorpo antagonista nativo, incluindo os ensaios aqui descritos.

Qualquer composição farmacêutica compreendendo um anticorpo antagonista anti-CD40 possuindo as propriedades de ligação aqui descritas como componente terapeuticamente ativo pode ser utilizado nos métodos aqui descritos. Desta forma composições líquidas, liofilizadas ou secas por pulverização compreendendo um ou mais dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da invenção podem ser preparadas como uma solução aquosa ou não aquosa ou suspensão para administração subsequente a um indivíduo de acordo com os métodos aqui revelados. Cada uma destas composições compreende pelo menos um dos anticorpos antagonistas anti-CD40 da presente invenção como componente terapeuticamente ou profilacticamente ativo. Por "componente terapeuticamente ou profilacticamente ativo" entende-se o anticorpo anti-CD40 especificamente incorporado na composição para produzir uma resposta terapêutica ou profilática desejada no que diz respeito ao tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou condição num sujeito quando a composição farmacêutica é administrada a esse sujeito. De preferência, as composições farmacêuticas compreendem agentes estabilizantes adequados, agentes de volume ou ambos, para minimizar os problemas associados com

perda de estabilidade da proteína e a atividade biológica durante a preparação e armazenagem.

Adjuvantes podem ser adicionados a composições farmacêuticas que compreendem um anticorpo antagonista anti-CD40 da invenção. Esses adjuvantes podem incluir, mas não estão limitados a, óleos, polímeros, vitaminas, hidratos de carbono, aminoácidos, sais, tampões, albumina, agentes tensioativos ou agentes de volume. De preferência, os hidratos de carbono incluem açúcar ou álcoois de açúcar, tais como mono-, di- ou polissacáridos, ou glucanos solúveis em água. Os sacáridos ou glucanos podem incluir frutose, glucose, manose, sorbose, xilose, maltose, sacarose, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina α e β , amido solúvel, hidroxietilamido e carboximetilcelulose, ou suas misturas. "Álcool de açúcar" é definido como um hidrocarboneto C_4 a C_8 possuindo um grupo hidroxilo, e inclui galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol e arabitól. Estes açúcares ou álcoois de açúcares podem ser usados individualmente ou em combinação. A concentração de açúcar ou álcool de açúcar situa-se entre 1,0% e 7% p/v, com maior preferência entre 2,0% e 6,0% p/v. De preferência, os aminoácidos incluem formas de carnitina levorotary (L), arginina e betaína; no entanto, outros aminoácidos podem ser adicionados. Os polímeros preferidos incluem polivinilpirrolidona (RVP), com um peso molecular médio entre 2000 e 3000, ou polietilenoglicol (PEG) com um peso molecular médio entre 3000 e 5000. Os agentes tensioativos que podem ser adicionados à formulação são mostrados nas EP 270799 e 268110.

Além disso, os anticorpos podem ser modificados quimicamente por conjugação covalente a um polímero para

aumentar a sua semivida circulante, por exemplo. Polímeros preferidos e métodos para anexá-los aos peptídeos, são mostrados nas Patentes US 4766106; 4179337; 4495285; e 4609546. Os polímeros preferidos são polióis polioxietilados e polietilenoglicol (PEG). O PEG é solúvel em água à temperatura ambiente e tem a fórmula geral: $R(O-CH_2-CHO_2)_nO-R$ em que R pode ser hidrogénio, ou um grupo protetor tal como um grupo alquilo ou alcanol. Preferencialmente, o grupo protetor tem entre 1 e 8 carbonos, mais preferivelmente é metilo. O símbolo n é um número inteiro positivo, preferencialmente entre 1 e 1000, mais preferencialmente entre 2 e 500. O PEG tem um peso molecular médio preferido entre 1000 e 40000, mais preferencialmente entre 2000 e 20000, mais preferencialmente entre 3000 e 12000. De preferência, o PEG tem pelo menos um grupo hidroxil, mais preferencialmente é um grupo hidroxil terminal. É este grupo hidroxil que é de preferência ativado para reagir com um grupo amino livre no inibidor. No entanto, será entendido que o tipo e quantidade dos grupos reativos podem ser variados para alcançar um conjugado covalente de PEG/anticorpo da presente invenção.

Polióis polioxietilados solúveis em água são também úteis na presente invenção. Incluem sorbitol polioxietilado, glucose polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), e semelhantes. O POG é preferido. Uma razão é porque a estrutura de glicerol do glicerol polioxietilado é a mesma estrutura que ocorre naturalmente em, por exemplo, em mono-di-, triglicéridos de animais e humanos. Portanto, esta ramificação não seria necessariamente vista como um agente estranho no corpo. O POG tem um peso molecular preferido na mesma gama que o PEG. A estrutura para o POG é mostrada

em Knauf et al. (1988) J. Bio. Chem. 263:15064-15070, e uma discussão de conjugados POG/IL-2 encontra-se na Patente US 4766106.

Outro sistema de entrega de fármaco para aumentar a semivida circulatória é o lipossoma. Métodos para preparar sistemas de entrega de lipossomas são discutidos em Gabizon et al. (1982) Cancer Research 42:4734; Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129; e Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467. Outros sistemas de entrega de fármacos são conhecidos na técnica e são descritos em, por exemplo, Poznansky et al. (1980) Drug Delivery Systems (RL Juliano, ed., Oxford, NY) pp. 253-315; Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277.

Os constituintes a serem incorporados numa composição farmacêutica devem prover à estabilidade do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. Isto é, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos pode reter a sua estabilidade física e/ou química e tem a atividade biológica desejada, ou seja, uma ou mais das atividades antagonistas aqui anteriormente definidas, incluindo, mas não limitado a, inibição da secreção de imunoglobulinas por células B periféricas humanas normais estimuladas por células T; inibição da sobrevivência e/ou a proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células de Jurkat T; inibição da sobrevivência e/ou a proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células expressando CD40 ou o ligando CD40L solúvel (sCD40L); inibição dos sinais intracelulares de "sobrevivência" anti-apoptóticos em qualquer célula estimulada por sCD40L ou CD40L em fase

sólida; inibição da transdução de sinal de CD40 em qualquer célula em ligação com fase sCD40L ou CD40L em fase sólida; e inibição da proliferação de células B malignas humanas tal como referido aqui noutra sítio.

Métodos para a monitorização da estabilidade da proteína são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Jones (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90; Lee, ed. (1991) Peptide and Protein Drug Delivery (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, Nova Iorque) E os ensaios de estabilidade aqui descritos abaixo. Geralmente, a estabilidade da proteína é medida a uma temperatura escolhida durante um período de tempo especificado. Em concretizações preferidas, uma formulação farmacêutica de anticorpo estável fornece a estabilidade do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo quando armazenada à temperatura ambiente (cerca de 25°C) durante pelo menos 1 mês, pelo menos, 3 meses, ou pelo menos 6 meses, e/ou permanece estável a cerca de 2-8°C, por pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, no mínimo, 12 meses, no mínimo, 18 meses, no mínimo, 24 meses.

Uma proteína tal como um anticorpo, quando formulada numa composição farmacêutica, considera-se como mantendo a sua estabilidade física num determinado ponto no tempo, se não demonstra sinais visuais (ou seja, descoloração ou perda de limpidez) ou sinais mensuráveis (por exemplo, usando cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) ou dispersão de luz UV) de precipitação, agregação e/ou desnaturação nessa composição farmacêutica. No que diz respeito à estabilidade química, uma proteína tal como um anticorpo, quando formulada numa composição farmacêutica, considera-se como mantendo a sua estabilidade química a um determinado ponto

no tempo, se as medições de estabilidade química são indicativas de que a proteína (ou seja, o anticorpo) retém a atividade biológica de interesse nessa composição farmacêutica. Métodos para a monitorização das alterações na estabilidade química são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, métodos para detectar as formas quimicamente alteradas da proteína, tal como o resultado de grampeamento, utilizando, por exemplo, SDS-PAGE, SEC e/ou dessorção de ionização a laser assistida por matriz/tempo de espectrometria de massa; e degradação associada a alterações na carga molecular (por exemplo, associada à desaminação), utilizando, por exemplo, cromatografia de troca iónica. Ver, por exemplo, os métodos aqui descritos abaixo.

Um anticorpo antagonista anti-CD40 ou fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, quando formulados numa composição farmacêutica, é considerado como retendo uma atividade biológica desejada a um dado ponto no tempo, se a atividade biológica desejada naquele momento está dentro de cerca de 30%, de preferência dentro cerca de 20% da atividade biológica desejada exibida na altura em que a composição farmacêutica foi preparada, conforme determinado num ensaio adequado para a atividade biológica desejada. Os ensaios para medir a atividade biológica desejada dos anticorpos antagonistas anti-CD40 aqui descritos, e os fragmentos de ligação ao antigénio dos mesmos, podem ser realizados como descrito nos exemplos aqui. Ver igualmente os ensaios descritos em Schultze et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8200-8204; Denton et al. (1998) Pediatr. Transplant. 2:6-15; Evans et al. (2000) J. Immunol. 164:688-697; Noelle (1998) Agents Actions Suppl. 49:17-22; Lederman et al. (1996) Curr. Opin. Hematol. 3:77-

86; Coligan et al. (1991) Current Protocols in Immunology 13:12; Kwekkeboom et al. (1993) Immunology 79:439-444; e Patentes US 5674492 e 5847082.

Em algumas formas de realização da invenção, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antígeno deste é formulado numa formulação farmacêutica líquida. O anticorpo antagonista anti-CD40 ou seu fragmento de ligação ao antígeno podem ser preparados utilizando qualquer método conhecido na técnica, incluindo os métodos aqui descritos acima. Numa concretização, o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo é produzido por via recombinante numa linha celular CHO.

Após a sua preparação e purificação, o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser formulado como uma formulação farmacêutica líquida da forma aqui estabelecida. Quando o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo está a ser armazenado antes da sua formulação, pode ser congelado, por exemplo, a $\leq -20^{\circ}\text{C}$, e em seguida descongelado à temperatura ambiente para posterior formulação. A formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos. A quantidade de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno presente na mesma formulação leva em consideração a via de administração e o volume de dose desejado.

Deste modo, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a 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 formas de realização, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 5,0 mg/ml, cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 10,0 mg/ml, cerca 10,0 mg/ml a cerca de 15,0 mg/ml, cerca de 15,0 mg/ml a cerca de 20,0 mg/ml, cerca de 20,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, cerca de 25,0 mg/ml a cerca de 30,0 mg/ml, cerca de 30,0 mg/ml a cerca de 35,0 mg/ml, cerca de 35,0 mg/ml a cerca de 40,0 mg/ml, cerca de 40,0 mg/ml a cerca de 45,0 mg/ml, ou cerca de 45,0 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml. Em outras formas de realização, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a 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 19,0 mg/ml, cerca de 20,0 mg/ml, cerca de 21,0 mg/ml, cerca de 22,0 mg/ml, cerca de 23,0 mg/ml, cerca de 24,0 mg/ml, ou cerca de 25,0 mg/ml. A composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo e um tampão que mantém o pH da formulação na gama de cerca de pH 5,0 a cerca 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 outro tais valores dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0. Em algumas

formas de realização, o tampão mantém o pH da formulação na gama 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 anticorpos anti-CD40 no intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0 pode ser usado na formulação, desde que a estabilidade físico-química e a atividade biológica desejada do anticorpo sejam mantidas como observado aqui acima. Os tampões adequados incluem, mas não estão limitados a, ácidos convencionais e os seus sais, em que o contra-íão pode ser, por exemplo, sódio, potássio, amónio, cálcio, ou magnésio. Exemplos de ácidos e de sais convencionais dos mesmos que podem ser usados para tamponar a formulação farmacêutica líquida incluem, mas não estão limitados a, tampões de ácido succínico ou succinato, ácido cítrico ou citrato, ácido acético ou acetato, ácido tartárico ou tartarato, ácido fosfórico e fosfato, ácido glucónico 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 tais dentro do intervalo de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas formas de realização, a concentração do tampão no interior da 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 tais dentro do intervalo de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM.

Em algumas formas de realização da invenção, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio deste e tampão de succinato ou tampão de citrato a uma concentração que mantém o pH da formulação na gama de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, preferencialmente de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5. Por "tampão de succinato" ou "tampão de citrato" entende-se um tampão compreendendo um sal de ácido succínico ou de um sal de ácido cítrico, respectivamente. Numa concretização preferida, o contra-íão succinato ou citrato é o catião sódio, e, portanto, o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio, respectivamente. No entanto, qualquer catião está previsto ser eficaz. Outros possíveis catiões de succinato ou citrato de incluem, mas não estão limitados ao, potássio, amónio, cálcio e magnésio. Como observado acima, 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 tais dentro do intervalo de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas formas de realização, a concentração do tampão no interior da 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 formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml, ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, e tampão de succinato ou tampão de citrato, por exemplo, tampão de succinato de sódio ou de citrato de sódio, a uma

concentração de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, cerca de 5 mM a cerca de 15 mM , de preferência cerca de 10 mM.

Quando é desejável que a formulação farmacêutica líquida seja próxima de isotónica, a formulação farmacêutica líquida compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, e um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, pode ainda compreender uma quantidade de um agente de isotonização suficiente para tornar a formulação perto de isotónica. Por "quase isotónica" entende-se a formulação aquosa que tem uma osmolaridade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360 mmol/kg, de preferência cerca de 240 a cerca de 340 mmol/kg, mais preferivelmente cerca de 250 a cerca de 330 mmol/kg, ainda mais preferencialmente cerca de 260 a cerca de 320 mmol/kg, ainda mais preferivelmente cerca de 270 a cerca de 310 mmol/kg. Métodos de determinação da isotonicidade de uma solução são bem conhecidos dos peritos na técnica. Ver, por exemplo, Setnikar et al. (1959) J. Am. Pharm. Assoc. 48:628.

Aqueles peritos na técnica estão familiarizados com uma variedade de solutos farmacêuticamente aceitáveis úteis no fornecimento de isotonicidade, em composições farmacêuticas. O agente isotónico pode ser qualquer reagente capaz de ajustar a pressão osmótica da formulação farmacêutica líquida da presente invenção a um valor aproximadamente igual ao de um fluido corporal. É desejável a utilização de um agente de isotonização fisiologicamente aceitável. Assim, a formulação

farmacêutica líquida que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, e um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, pode ainda compreender componentes que podem ser utilizados para proporcionar isotonicidade, por exemplo, cloreto de sódio; aminoácidos tais como alanina, valina e glicina; açúcares e álcoois de açúcar (polióis), incluindo, mas não se limitando a, glucose, dextrose, frutose, sacarose, maltose, manitol, trealose, glicerol, sorbitol e xilitol; ácido acético e outros ácidos orgânicos ou os seus sais, e quantidades relativamente pequenas de citratos ou fosfatos. A pessoa normalmente perita saberia de agentes adicionais que são adequados para proporcionar tonicidade óptima da formulação líquida.

Em algumas concretizações preferidas, a formulação farmacêutica líquida que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, e um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, compreende ainda cloreto de sódio como agente isotonizante. A concentração de cloreto de sódio na formulação dependerá da contribuição de outros componentes para a tonicidade. Em algumas formas de realização, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, cerca de 50 mM a cerca de 250 mM, cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, cerca de 50 mM a cerca de 175 mM, cerca de 50 mM a cerca de 150 mM, cerca de 75 mM a cerca de 175 mM, cerca de 75 mM a cerca de 150 mM,

cerca de 100 mM a cerca de 175 mM, cerca de 100 mM a cerca de 200 mM, cerca de 100 mM a cerca de 150 mM, cerca de 125 mM a cerca de 175 mM, cerca de 125 mM a cerca de 150 mM, cerca de 130 mM a cerca de 170 mM, cerca de 130 mM a cerca de 160 mM, cerca de 135 mM a cerca de 155 mM, cerca de 140 mM a cerca de 155 mM, ou cerca de 145 mM a cerca de 155 mM. Numa tal forma de realização, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM. Em outras dessas concretizações, a concentração de cloreto de sódio é de cerca de 150 mM, o tampão é tampão de succinato de sódio ou citrato de sódio a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, compreendendo a formulação farmacêutica líquida uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, 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 formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, cerca de 150 mM de cloreto de sódio, e cerca de 10 mM de succinato de sódio ou citrato de sódio, a um pH de cerca de pH 5,5.

A degradação de proteínas devido ao congelamento e descongelamento ou cisalhamento mecânico durante o processamento de formulações farmacêuticas líquidas da presente invenção pode ser inibida por incorporação de agentes tensioativos na formulação a fim de diminuir a tensão superficial na interface ar-solução. Assim, em

algumas formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, e compreende ainda um agente tensioativo. Em outras formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, um tampão para manter o pH da formulação dentro do intervalo de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, um agente de isotonicidade tal como cloreto de sódio a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, e compreende ainda um agente tensioativo.

Agentes tensioativos típicos utilizados são agentes tensioativos não iónicos, incluindo ésteres de polioxietileno-sorbitol tais como o polisorbato 80 (Tween 80) e polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno como o Pluronic F68; álcoois de polioxietileno tais como Brij 35; simeticona; polietilenoglicol tal como PEG400; lisofosfatidilcolino; e polioxietileno-p-t-octilfenol, tais como Triton X-100. A estabilização clássica de composições farmacêuticas com agentes tensioativos ou emulsionantes é descrita, por exemplo, em Levine et al. (1991) J. Parenteral Sci. Technol. 45 (3): 160-165. Um agente tensioativo preferido utilizado na prática da presente invenção é o polissorbato 80. Quando um agente tensioativo está incluído, é tipicamente adicionado numa quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (p/v), cerca de 0,001% a cerca de 0,5%, cerca

de 0,001% a cerca de 0,4%, cerca de 0,001% a cerca de 0,3%, cerca de 0,001% a cerca de 0,2%, cerca de 0,005% a cerca de 0,5%, cerca de 0,005% a cerca de 0,2%, cerca de 0,01% a cerca de 0,5%, cerca de 0,01% a cerca de 0,2%, cerca de 0,03% a cerca de 0,5%, cerca de 0,03% a cerca de 0,3%, cerca de 0,05% a cerca de 0,5%, ou cerca de 0,05% a cerca de 0,2%.

Assim, em algumas formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, o tampão é succinato de sódio ou citrato de sódio a uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, cerca de 5 mM a cerca de 25 mM, ou cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, a formulação 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, e a formulação compreende ainda um agente tensioativo, por exemplo, polisorbato 80, numa quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% ou cerca de 0,001% a cerca de 0,5%. Tais formulações podem compreender, opcionalmente, um agente de isotonicidade, tais como cloreto de sódio a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, ou cerca de 50 mM a cerca de 150 mM. Em outras formas de realização, a formulação farmacêutica líquida compreende o anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou o fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/ml a cerca de 50,0 mg/ml ou cerca de 5,0 mg/ml a cerca de 25,0 mg/ml, 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 citrato de sódio, a cerca de 5 mM a cerca 20 mM, incluindo cerca de 10 mM de succinato de sódio ou citrato de sódio; cloreto de sódio a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, incluindo cerca de 150 mM; e opcionalmente um agente tensioativo, por exemplo, polisorbato 80, numa quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0%, incluindo de cerca de 0,001% a cerca de 0,5%; onde a formulação farmacêutica líquida tem um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0.

A formulação farmacêutica líquida pode estar essencialmente isenta de quaisquer conservantes e outros veículos, excipientes, ou estabilizadores aqui mencionados acima. Alternativamente, a formulação pode incluir um ou mais conservantes, por exemplo, agentes antibacterianos, veículos farmacêuticamente aceitáveis, excipientes, ou estabilizadores aqui descritos acima, desde que não afetem adversamente a estabilidade físico-química do anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo. Exemplos de veículos aceitáveis, excipientes ou estabilizantes incluem, mas não estão limitados a, agentes tamponantes adicionais, co-solventes, agentes tensioativos, antioxidantes, incluindo ácido ascórbico e metionina, agentes quelantes como o EDTA, complexos de metal (por exemplo, complexos de proteína Zn), e polímeros biodegradáveis tais como poliésteres. Uma discussão completa da formulação e seleção dos transportadores farmacêuticamente aceitáveis, estabilizantes e isomolites pode ser encontrada em

Remington's Pharmaceutical Sciences (18 ed;. Mack Publishing Company, Eaton, Pensilvânia, 1990).

Após a formulação farmacêutica líquida ou outra composição farmacêutica aqui descrita ser preparada, pode ser liofilizada para evitar a degradação. Os métodos para a liofilização de composições líquidas são conhecidos dos vulgares peritos na técnica. Imediatamente antes da utilização, a composição pode ser reconstituída com um diluente estéril (solução de Ringer, água destilada ou soro fisiológico estéril, por exemplo) que pode incluir ingredientes adicionais. Após a reconstituição, a composição é preferencialmente administrada a indivíduos utilizando os métodos que são conhecidos dos peritos na técnica.

Uso de anticorpos antagonistas anti-CD40 no fabrico de medicamentos

A presente divulgação também proporciona a utilização de um anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio deste na produção de um medicamento para tratamento de um sujeito com um cancro caracterizado pelo crescimento de células B neoplásicas, em que o medicamento é coordenado com o tratamento com pelo menos uma outra terapia do cancro. Cancros caracterizadas pelo crescimento de células B neoplásicas incluem, mas não estão limitados a, os cancros relacionados com células B aqui discutidos acima, por exemplo, linfoma não-Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiplo, linfoma de células B, linfoma de células B de alto grau, linfoma de células B de grau intermédio, linfoma de células B de baixo grau, leucemia linfobástica aguda de células B, leucemia mieloblástica, doença de Hodgkin, plasmocitoma, linfoma

folicular, linfoma de células pequenas clivadas foliculares, linfoma de células grandes foliculares, linfoma misto de células pequenas clivadas foliculares, linfoma de células pequenas clivadas difusas, linfoma linfocítico pequeno difuso, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmocitário, linfoma da zona marginal, linfoma de tecido linfóide associado à mucosa, linfoma de células B monocitóide, linfoma esplênico, leucemia de células pilosas, linfoma de grandes células difusas, linfoma de grandes células B mediastinais, granulomatose linfomatóide, linfomatose intravascular, linfoma misto de células difusas, linfoma difuso de grandes células, linfoma imunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado com a SIDA e linfoma de células do manto.

Por "coordenada" entende-se o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que está a ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com pelo menos uma outra terapia do cancro. Exemplos de outras terapias do cancro incluem, mas não estão limitados a, cirurgia; radioterapia; quimioterapia; opcionalmente em combinação com transplante autólogo de medula óssea, em que os agentes quimioterapêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a, fludarabina ou fosfato de fludarabina, clorambucil, vincristina pentostatina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina), ciclofosfamida, doxorubicina, prednisona e combinações dos mesmos, por exemplo, regimes contendo antraciclinas como CAP (ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona), CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona mais doxorubicina), VAD (vincristina, doxorubicina e dexametasona), MP (melfalano e prednisona), e outros agentes citotóxicos e/ou terapêutico utilizados em

quimioterapia, tais como mitoxantrona, daunorubicina, idarubicina, asparaginase, e antimetabolitos, incluindo, mas não limitados a, citarabina, metotrexato, decarbazina 5-fluorouracilo, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina e nelarabina; outra terapia de anticorpo monoclonal anti-cancro (por exemplo, alemtuzumab (Campath®) ou outro anticorpo anti-CD52 visando a glicoproteína de superfície celular CD52 em células B malignas; rituximab (Rituxan®), o anticorpo inteiramente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), ou qualquer outro anticorpo anti-CD20 terapêutico visando o antígeno CD20 nas células B malignas; anticorpo anti-CD19 (por exemplo, MT103, um anticorpo biespecífico); anticorpo anti-CD22 (por exemplo, o anticorpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) ou outros anticorpos anti-cancro visando o factor de crescimento endotelial vascular humano; anticorpo anti-CD22 visando o antígeno CD22 nas células B malignas (por exemplo, o anticorpo monoclonal BL-22, uma toxina alphaCD22); anticorpo α -M-CSF visando o factor estimulante de colónias de macrófagos; anticorpos que visam o receptor ativador do factor nuclear-kappaB (RANK) e o seu ligando (RANKL), os quais são superexpressos no mieloma múltiplo; o anticorpo anti-CD23, visando o antígeno CD23 nas células B malignas (por exemplo, IDEC-152); anticorpo anti-CD38, visando o antígeno CD38 nas células B malignas; anticorpos visando o complexo principal de histocompatibilidade de classe II receptores (anticorpos anti-MHC) expressos em células B malignas; outros anticorpos anti-CD40 (por exemplo, SGN-40) visando o antígeno CD40 em células B malignas; e anticorpos visando o indutor de apoptose do ligando do receptor 1 relacionado com o factor de necrose tumoral (TRAIL-R1) (por exemplo, o anticorpo monoclonal agonista humano HGS-ETR1), expresso

num número de tumores sólidos e tumores de origem hematopoiética; terapia do cancro baseada em moléculas pequenas, incluindo, mas não limitado a, inibidores de microtúbulos e/ou da topoisomerase (por exemplo, o inibidor mitótico da dolastatina e análogos de dolastatina; o agente de ligação à tubulina T900607; XL119; e o inibidor da topoisomerase aminocamptotecina), SDX-105 (cloridrato de bendamustina), ixabepilona (um análogo de epotilona, também conhecido como BMS-247550), inibidores da proteína quinase C, por exemplo, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoílestaurosporina), pixantrona, eloxatin (um agente antineoplásico), Ganite (nitrato de gálio), Thalomid® (talidomida), derivados imunomoduladores da talidomida (por exemplo, revlimid (anteriormente revimid)), Affinitak™ (inibidor antessentido da proteína quinase C-alfa), SDX-101 (R-etodolac, induzindo a apoptose de linfócitos malignos) e os análogos de nucleósidos de purina de segunda geração tais como clofarabina, inibidores da produção da proteína Bcl-2 por células cancerosas (por exemplo, os agentes antessentido oblimersen e Genasense®), inibidores de proteassoma (por exemplo, Velcade™ (bortezomib)), pequenas moléculas inibidoras da quinase (por exemplo, CHIR-258), inibidores de VEGF de moléculas pequenas (por exemplo, ZD-6474), inibidores de pequenas moléculas da proteína de choque térmico (HSP) 90 (por exemplo, 17-AAG), inibidores de moléculas pequenas de desacetilases de histona (por exemplo, a agentes de citodiferenciação híbridos/polares HPC) tais como ácido suberanilohidroxâmico (SAHA), e FR-901228) e os agentes apoptóticos tais como Trisenox® (trióxido de arsénico) e Xcytrin® (motexafin gadolínio); terapias contra o cancro à base de vacina/imunoterapia, incluindo, mas não limitado a, abordagens da vacina (por exemplo, Id-KLH, Oncophage, vitaethine), imunoterapia personalizada ou imunoterapia idiotípica ativa (por

exemplo, imunoterapia personalizada MyVax[®], formalmente designado GTOP-99), ProMune[®] (CpG 7909, um agonista sintético do tipo receptor 9 (TLR9)), terapia com interferão-alfa, terapia com interleucina-2 (IL-2), terapia com IL-12, terapia com IL-15, e terapia com IL-21, terapia esteroide, ou outra terapia de cancro; em que o tratamento com a terapia do cancro adicional, ou terapêuticas adicionais do cancro, ocorrem antes, durante, ou subsequentemente ao tratamento do sujeito com o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo, como aqui referido acima.

Em algumas formas de realização, a presente divulgação proporciona a utilização do anticorpo anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antigénio deste na produção de um medicamento para o tratamento de um linfoma de células B, por exemplo, o linfoma de não-Hodgkin, num indivíduo, em que o medicamento é coordenado com o tratamento com pelo menos uma outra terapia do cancro selecionada a partir do grupo que consiste em quimioterapia, terapia de anticorpos anti-cancro, terapia do cancro baseada em moléculas pequenas, e terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia, em que o medicamento é para ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito com a outra terapia de cancro, ou, no caso de várias terapias de combinação, quer antes, durante ou após o tratamento do sujeito com as outras terapias contra o cancro.

Assim, por exemplo, em algumas formas de realização, a revelação providencia o uso do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antigénio

deste, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um linfoma de células B, por exemplo, linfoma de não-Hodgkin, num indivíduo, em que o medicamento é coordenado com o tratamento com quimioterapia, onde o agente quimioterapêutico é selecionado a partir do grupo consistindo de citoxano, doxorubicina, vincristina, prednisona, e combinações dos mesmos, por exemplo CHOP. Em outras formas de realização, a revelação providencia o uso do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um linfoma de células B, por exemplo, linfoma não-Hodgkin, num sujeito, em que o medicamento é coordenado com o tratamento com pelo menos um outro anticorpo anti-cancro selecionado entre o grupo que consiste em alemtuzumab (Campath®) ou outro anticorpo anti-CD52 visando a glicoproteína de superfície celular CD52 nas células B malignas; rituximabe (Rituxan®), o anticorpo inteiramente humano HuMax-CD20, R-1594, IMMU-106, TRU-015, AME-133, tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®), ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), ou qualquer outra terapêutica do anticorpo anti-CD20 visando o antígeno CD20 nas células B malignas; anticorpo anti-CD19 (por exemplo, MT103, um anticorpo biespecífico); anticorpo anti-CD22 (por exemplo, o anticorpo monoclonal humanizado epratuzumab); bevacizumab (Avastin®) ou outro anticorpo anti-cancro visando o factor de crescimento endotelial vascular humano, e quaisquer combinações dos mesmos; em que o medicamento é para ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito com a outra terapia de cancro, ou, no caso de várias terapias de combinação, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com outras terapias do cancro.

Ainda noutras formas de realização, a presente divulgação fornece o uso do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antigénio deste, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um linfoma de células B, por exemplo, linfoma, não-Hodgkin, num sujeito, em que o medicamento coordenado com o tratamento com pelo menos uma outra terapia do cancro baseada em moléculas pequenas selecionado de entre o grupo consistindo de microtúbulos e/ou inibidores da topoisomerase (por exemplo, o inibidor da mitose da dolastatina, dolastatina e análogos, agente de ligação à tubulina T900607; XL119, e o inibidor da topoisomerase aminocamptotecina), SDX-105 (cloridrato de bendamustina), ixabepilona (um análogo de epotilona, também conhecido como BMS-247550), inibidores da proteína quinase C, por exemplo, midostaurin ((PKC-412, CGP 41251, N-benzoílestaurosporina), pixantrona, eloxatin (um agente antineoplásico), ganite (nitrato de gálio), Thalomid[®] (talidomida), um agente de apoptose, tais como Xcytrin[®] (motexafin gadolínio), os inibidores da produção da proteína Bcl-2 por células cancerosas (por exemplo, os agentes antessentido oblimersen e Genasense[®]), nelarabina, e quaisquer combinações destes; em que o medicamento é para ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito com a outra terapia de cancro, ou no caso de terapias de combinação, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com as outras terapias do cancro.

Em ainda outras concretizações, a presente divulgação proporciona a utilização do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antigénio deste, no fabrico de um medicamento para o tratamento de um linfoma de células B, por exemplo, linfoma não-Hodgkin, num sujeito, em que o medicamento é coordenado com o tratamento

com pelo menos uma outra terapia do cancro baseada em vacina/imunoterapia selecionada a partir do grupo que consiste em abordagens de vacina (por exemplo, Id-KLH, Oncophage, vitalethine), imunoterapia personalizada ou imunoterapia idiotípica ativa (por exemplo, imunoterapia personalizada MyVax[®], formalmente designado por GTOF-99), ProMune[®] (CPG 7909, um agonista sintético para o tipo de receptor 9 (TLR9)), a terapia com interleucina-2 (IL-2); terapia com IL-12; terapia com IL-15; e terapia com IL-21; e quaisquer combinações destas, em que o medicamento é para ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito com a outra terapia de cancro, ou, no caso da combinação múltipla de terapias, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com outras terapias do cancro.

Em algumas formas de realização, a presente divulgação proporciona a utilização do anticorpo anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste na produção de um medicamento para o tratamento de uma leucemia relacionada com a célula-B, por exemplo, leucemia linfocítica aguda de células B (LLA-B), num sujeito, em que o medicamento coordenado com o tratamento com pelo menos uma outra terapia do cancro selecionada a partir do grupo consistindo em quimioterapia e terapia anti-metabolito, em que o medicamento é para ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito com a outra terapia de cancro, ou, no caso de várias terapias de combinação, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com outras terapias do cancro. Exemplos de tais formas de realização incluem, mas não estão limitados a, aqueles casos em que o medicamento compreendendo o anticorpo

antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou um fragmento de ligação ao antígeno deste é coordenado com o tratamento com um agente quimioterapêutico ou anti-metabolito selecionado entre o grupo consistindo em citoxano, doxorubicina, vincristina, prednisona, citarabina, mitoxantrona, idarubicina, asparaginase, metotrexato, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, e suas combinações; em que o medicamento é para ser usado quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito com a outra terapia de cancro, ou, no caso de várias terapias de combinação, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com outras terapias do cancro. Num exemplo, o medicamento coordenado com o tratamento com citarabina mais daunorubicina, mitoxantrona mais citarabina, e/ou mais citarabina idarubicina, em que o medicamento é para ser usado, quer antes, durante ou depois do tratamento do sujeito B-ALL com a outra terapia de cancro, ou, no caso de várias terapias de combinação, quer antes, durante ou depois do tratamento do indivíduo com outras terapias do cancro.

É também revelado neste documento o uso de um anticorpo antagonista anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 aqui divulgado, ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo no fabrico de um medicamento para tratamento de um sujeito para um cancro caracterizado pelo crescimento de células B neoplásicas, incluindo os cancros relacionados com células B aqui descrito acima, em que o medicamento é utilizado num sujeito que tenha sido pré-tratado com pelo menos uma outra terapia do cancro. Por "pré-tratamento" ou "pré-tratamento" entende-se o sujeito que recebeu uma ou mais outras terapias do cancro (isto é, foi tratado com pelo menos uma outra terapia do

cancro), antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio. "Pré-tratado" ou "pré-tratamento" inclui indivíduos que foram tratados com pelo menos uma outra terapia do cancro dentro de 2 anos, 18 meses depois, dentro de um ano, dentro de 6 meses, dentro de 2 meses, dentro de 6 semanas, no prazo de um mês, a 4 semanas, no prazo de 3 semanas, dentro de 2 semanas, dentro de uma semana, dentro de 6 dias, dentro de 5 dias, após 4 dias, dentro de 3 dias, dentro de 2 dias, ou mesmo dentro de 1 dia antes do início do tratamento com o medicamento compreendendo o antagonista anticorpo anti-CD40, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 aqui divulgado, ou um fragmento de ligação ao antigénio dos mesmos. Não é necessário que o sujeito tenha uma resposta para o pré-tratamento com a terapia do cancro ou antes, terapêuticas anteriores do cancro. Assim, o sujeito que recebe o medicamento compreendendo o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio do mesmo poderia ter reagido, ou poderia ter deixado reagir (ou seja, o cancro era refractário), ao pré-tratamento com a terapia do cancro antes, ou uma ou mais das terapias do cancro anteriores em que o pré-tratamento compreendia várias terapias do cancro. Exemplos de outras terapias do cancro as quais o sujeito possa ter recebido durante o pré-tratamento antes de receber o medicamento que compreende o anticorpo antagonista anti-CD40 ou o fragmento de ligação ao antigénio deste incluem, mas não estão limitados a, cirurgia; radioterapia; quimioterapia; opcionalmente em combinação com transplante autólogo de medula óssea, em que os agentes quimioterapêuticos adequados incluem, mas não estão limitados a, aquelas listados aqui acima; outra terapia de anticorpo monoclonal anti-cancro, incluindo, mas não limitado a, os anticorpos anti-cancro aqui acima

listados, com base em terapia do cancro de pequenas moléculas, incluindo, mas não limitado a, as moléculas pequenas aqui listados acima; terapias do cancro baseadas em vacina/imunoterapia, incluindo, mas limitados a, aqueles listados aqui acima; terapia de esteroides; outra terapia de cancro, ou qualquer combinação destes.

"Tratamento" no contexto do uso coordenado de um medicamento aqui descrito com um ou mais outras terapias do cancro é aqui definido como a aplicação ou a administração do medicamento ou de outra terapia de cancro a um sujeito, ou a aplicação ou a administração do medicamento ou outra terapia de cancro a um tecido isolado ou linha celular de um sujeito, em que o sujeito tem um cancro caracterizado por um crescimento neoplásico das células B, um sintoma associado com um tal cancro ou uma predisposição para o desenvolvimento de um tal cancro, onde o objectivo é o de curar, curar, aliviar, aliviar, alterar, corrigir, melhorar, melhorar, ou afetar o cancro, os sintomas associados ao cancro, ou a predisposição para o desenvolvimento do cancro.

Os exemplos que se seguem são oferecidos como forma de ilustração e não como forma de limitação.

EXPERIMENTAL

Os anticorpos antagonistas anti-CD40 usados nos exemplos abaixo são CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 anti-CD40 são de anticorpos monoclonais anti-CD40 humanos do subtipo IgG₁ humana (mAb) gerados pela imunização de ratos transgênicos que carregam o lócus da cadeia pesada de IgG₁ humana e locus de cadeia leve κ humano (tecnologia XenoMouse[®]; Abgenix; Fremont, Califórnia). Como mostrado por meio de análise FACS, CHIR-

5.9 e CHIR-12.12 ligam especificamente ao CD40 humano e podem evitar a ligação do ligando CD40. Ambos os mAbs podem competir com o ligante CD40 pré-ligado na superfície celular CD40. Ambos os anticorpos são antagonistas fortes e inibem *in vitro* a proliferação de CD40 mediada pelo ligando de células B normais, assim como as células de cancro a partir de pacientes com NHL e LLC. *In vitro*, ambos os anticorpos matam as linhas celulares de cancro, bem como células primárias de cancro a partir de pacientes com NHL por ADCC. A atividade anti-tumor dependente da dose foi observada num modelo de xenoenxerto de linfoma humano. A afinidade de ligação do CHIR-5.9 ao CD40 humano é $1,2 \times 10^{-8}$ M e a afinidade de ligação de CHIR-12.12 ao CD40 humano é 5×10^{-10} M.

A linha hibridoma do rato 131.2F8.5.9 (CMCC # 12047) e linha de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC # 12056) foram depositadas na American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd, Manassas, Virginia 20110-2209 (EUA)] sob a patente de depósito n° PTA-5542 e PTA-5543, respectivamente.

Os seguintes protocolos foram utilizados nos exemplos descritos a seguir.

Ensaio de ELISA para a quantificação de imunoglobulinas

As concentrações de IgM e IgG humanas foram estimadas por ELISA. Placas de 96 poços de ELISA foram revestidas com 2 µg/ml de IgG de cabra anti-humano de mAb (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) ou com 2 µg/ml de IgM de cabra anti-humano de mAb 4102 (Bio Source International, Califórnia) em 0,05 M de tampão carbonato (pH 9,6), por

incubação durante 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS, 0,05% de Tween-20 (PBS-Tween) e saturadas com BSA durante 1 hora. Após 2 lavagens, as placas foram incubadas durante 2 horas a 37°C com diferentes diluições das amostras de teste. Após 3 lavagens, a Ig ligada foi detectada por incubação durante 2 horas a 37°C com 1 µg / ml de peroxidase marcada com IgG de cabra anti-humana MAb ou cabra anti-humana IgM Mab. As placas foram lavadas quatro vezes, e a atividade da peroxidase ligada foi revelada pela adição de O-fenilenodiamina como substrato. Padrões de IgG humana ou de IgM (Caltag, Burlingame, Califórnia) foram utilizados para estabelecer uma curva padrão para cada ensaio.

Isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) a partir de sangue periférico humano

20 ml de solução de Ficoll-Paque (de baixa endotoxina; Pharmacia) foi adicionada por tubo de poliestireno de 50 ml, em 3 tubos, 30 minutos antes da adição do sangue. A solução de Ficoll-Paque foi aquecida até à temperatura ambiente. 3 L de água sanitária na diluição de 1:10 foi preparada e usada para lavar todos os tubos e pipetas em contacto do sangue. O sangue foi posto em camadas no topo da solução de Ficoll-Paque sem perturbar a camada de Ficoll, a 1,5 ml de sangue/1 ml de Ficoll-Paque. Os tubos foram centrifugados a 1700 rpm durante 30 minutos à temperatura ambiente com o travão do centrifugador desligado. Como a maior parte da camada superior (plasma) foi removido como possível, minimizando o vácuo, a fim de evitar a remoção da segunda camada de solução. A segunda camada, que contém os linfócitos B e T, foi recolhida usando uma pipeta de Pasteur estéril, e colocada em dois tubos de poliestireno de 50 ml. A recolha foi diluída com 3 x o volume de RPMI frio sem aditivos, e os tubos foram

centrifugados a 1000 rpm durante 10 minutos. Os meios foram removidos por aspiração, e as células de ambos os tubos de 50 ml foram ressuspensas num total de 10 ml de RPMI frio (com aditivos) e transferidas para um tubo de 15 ml. As células foram contadas utilizando o hemacitómetro, em seguida, centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos. O meio foi removido e as células ressuspensas em 4 ml de RPMI. Esta fracção continha a CMSP.

Isolamento das células B a partir de PBMC

100 µl de Dynabeads (anti-h CD19) foram colocados num tubo de plástico de 5 ml. 3 mL de PBS estéril foram adicionados aos grânulos e misturados, e colocados no suporte magnético, em seguida, deixados em repouso durante 2 minutos. A solução foi removida usando uma pipeta de Pasteur. 3 mL de PBS estéril foram adicionados, misturados e colocados no suporte magnético, em seguida, deixados em repouso durante 2 minutos. Este procedimento com PBS estéril foi repetido mais uma vez para um total de 3 lavagens. O PBMC foi adicionado às esferas e incubado, durante a mistura, durante 30 minutos a 40°C. O tubo contendo o PBMC e as esferas foi colocado no suporte magnético durante 2 minutos, em seguida, a solução foi transferida para um novo tubo de 5 ml no suporte magnético. Após 2 minutos, a solução foi transferida para um novo tubo de 15 ml. Este passo foi repetido por mais quatro vezes e as soluções das primeiras quatro vezes foram recolhidas no tubo de 15 ml e em seguida centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Este passo produziu o sedimento para a separação de células T.

100 µl de RPMI (com aditivos) foi adicionado para recolher as esferas, e a solução foi transferida para um tubo de 0,7

ml. 10 µl de contas Dynal Detacha foram adicionados à suspensão à temperatura ambiente, e foi permitida a sua rotação durante 45 minutos. A suspensão foi transferida para um novo tubo de 5 ml e foram adicionados 3 ml de RPMI (com aditivos). O tubo foi colocado no suporte magnético durante 2 minutos. A solução foi transferida para um novo tubo de 5 ml no suporte durante 2 minutos, em seguida, para um tubo de 15 ml. O passo anterior foi repetido mais três vezes, recolhendo a solução no tubo de 15 ml. O tubo de 15 ml foi centrifugado a 1000 rpm durante 10 minutos, e as células ressuspensas em 10 ml de RPMI. O passo de lavagem foi repetido mais duas vezes para um total de 3 lavagens. As células foram contadas antes da última centrifugação. Este passo completou a purificação das células B. As células foram armazenadas em 90% de FCS e 10% de DMSO e congeladas a -800°C.

Isolamento das células T

A Coluna de Enriquecimento de células T humanas (R & D Systems, kit de coluna anti-h CD 3) foi preparada utilizando-se 20 ml de tampão de lavagem 1 X coluna por mistura de 2 ml de 10 X tampão de lavagem de coluna e 18 ml de água destilada estéril. A coluna foi limpa com etanol a 70% e colocada em cima de um tubo de 15 ml. A tampa superior da coluna foi removida em primeiro lugar para evitar o aparecimento de ar na parte inferior da coluna. Em seguida, a tampa inferior foi removida, e a ponta foi limpa com etanol a 70%. O líquido dentro da coluna foi deixado a escorrer para dentro do tubo de 15 ml. Um novo tubo estéril de 15 mL foi colocado na coluna após o tampão da coluna ter escorrido para o nível do filtro branco. A depleção de células B da fracção de PBMC foi suspensa em 1 ml de tampão e adicionada ao topo da coluna. As células foram deixadas a incubar com a coluna à temperatura

ambiente durante 10 minutos. As células T foram eluídas da coluna com quatro alíquotas de 2 ml cada de 1 x tampão de lavagem da coluna. As células T recolhidas foram centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 10 ml de RPMI. As células foram contadas e centrifugada mais uma vez. O sobrenadante foi removido, completando a purificação de células T. As células foram armazenadas em 90% de FCS e 10% de DMSO e congeladas a -80°C.

Para os procedimentos acima, a composição de RPML continha 10% de FCS (inativado a 56°C durante 45 min), 1% de Pen/Strep (100 u/ml de penicilina, 0,1 µg/ml de estreptomicina), 1% de glutamato, 1% de puravate de sódio, 50 µM de 2-ME.

Ensaio citofluorométrico de fluxo

Células de Ramos (106 células/amostra) foram incubadas em 100 µl de anticorpo primário (10 µg/ml em PBS-BSA) durante 20 min a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA, as células foram incubadas em 100 µl com fragmentos F(ab')₂ de anticorpos de cabra anti-(IgG humana) (Caltag) marcados com FITC durante 20 min a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA e uma lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS. As análises foram realizadas com um FACSCAN V (Becton Dickinson, San José, Califórnia).

Geração de Clones de Hibridoma

Os esplenócitos de ratinhos imunizados foram fundidos com as células de mieloma murino SP 2/0 ou P 3 x 63Ag8.653 numa razão de 10:1 usando 50% de polietilenoglicol como previamente descrito por de Boer et al. (1988) J. Immunol. Meth. 113:143. As células fundidas foram ressuspensas em

meio IMDM completo suplementado com hipoxantina (0,1 mM), aminopterina (0,01 mM), timidina (0,016 mM) e 0,5 ng/ml de hIL-6 (Genzyme, Cambridge, Massachusetts). As células fundidas foram então distribuídas entre os poços de placas de cultura de tecidos de 96 poços, de modo que cada poço continha em média 1 hibridoma de crescimento.

Após 10-14 dias, os sobrenadantes das populações de hibridomas foram rastreados para a produção de anticorpo específico. Para o rastreio da produção de anticorpos específicos pelos clones de hibridoma, os sobrenadantes de cada cavidade foram reunidos e testados para a especificidade de atividade dos anticorpos anti-CD40 por ELISA, em primeiro lugar. Os positivos foram então utilizados para a coloração fluorescente de células de células B transformadas por EBV, tal como descrito para o ensaio de FACS acima. As células de hibridoma positivas foram clonadas duas vezes por diluição limitante em IMDM/FBS contendo 0,5 ng/ml de hIL-6.

Exemplo 1: Produção de anticorpos anti-CD40

Vários anticorpos monoclonais antagonistas anti-CD40 totalmente humanos do isotipo IgG1 de foram gerados. Os ratinhos transgênicos portadores do locus de IgG1 humana de cadeia pesada do locus de cadeia humana κ (Abgenix γ -1 tecnologia XenoMouse® (Abgenix, Fremont, California)) foram utilizados para gerar estes anticorpos. As células de insecto SF9 expressando o domínio extracelular de CD40 foram usadas como imunogénio. Um total de 31 baços de rato foi fundido com as células do mieloma do rato SP2/0 para gerar 895 anticorpos que reconhecem o CD40 recombinante em ELISA (Tabelas 1A e 1B). Em média, cerca de 10% dos hibridomas produzidos usando a tecnologia Abgenix

XenoMouse[®] podem conter a cadeia leve lambda de ratinho em vez da cadeia kappa humana. Os anticorpos contendo a cadeia leve lambda de rato foram selecionados. Uns subconjuntos de 260 anticorpos que também mostraram uma ligação na superfície celular de CD40 foram selecionados para posterior análise. Hibridomas estáveis selecionados durante uma série de procedimentos de subclonagem foram usados para a posterior caracterização, em ensaios de ligação e funcionais.

Tabela 1A. Fusão típica

	anti-CD40 titer				
Fusion #	(1:100K)	Fusion Efficiency	# of wells screened	# of ELISA+	# of cell surface+
153	3	100%	960	123	33
154	4.67	15%	140	0	0
155	6	~40%	960	3	3
156	3.17	~25%	220	1	0
157	4.67	90%	960	32	6
158	4.4	90%	960	23	8
159	1.17	100%	960	108	18
160	1.78	90%	960	30	5
Total			6120	320	73

Tabela 1B. Resumo de quatro conjuntos de fusões

# of mice	ELISA-positive hybridomas	Cell surface positive Hybridomas
31	895	260

Tabela 2. Resumo do conjunto inicial de dados com anticorpos anti-CD40 IgG1

Mother Hybridoma	Hybridoma clones	cell surface binding	Antagonist	ADCC	CDC	CMCC#	V-region DNA sequence
	131.2F5.8.5.1	+++	++	ND	ND	ND	
131.2F5	131.2F5.8.5.9	+++	+++	++	-	12047	Yes
	131.2F5.8.5.11	+++	+++	++	-	12055	Yes
	153.3C5D8D7.8.4.7.1	++	ND	ND	ND	ND	
153.3C5	153.3C5D8D7.8.4.7.8	++	ND	ND	ND	ND	
	153.3C5D8D7.8.4.7.11	+++	+++	+	ND	ND	
	153.1D2.9.1	+++	ND	ND	ND	12067	
153.1D2	153.1D2.9.8	+++	+++	++	-	12057	
	153.1D2.9.12	+++	ND	ND	ND	12068	
	158.6F3.5.1	+++	+++	++	-	12054	Yes

Mother Hybridoma	Hybridoma clones	cell surface binding	Antagonist	ADCC	CDC	CMCC#	V-region DNA sequence
158.6F3	158.6F3.5.7	+++	ND	ND	ND	12061	
	158.6F3.5.10	+++	ND	ND	ND	12062	
	153.8E2D10D6.12.7	+++	ND	ND	ND	12075	
153.8E2_	153.8E2D10D6.12.9	+++	ND	ND	ND	12063	
	153.8E2D10D6.12.12	+++	+++	++++	-	12056	Yes
	155.2C2E9F12.2.10.4	+++	+/-	ND	ND	12064	
155.2C2	155.2C2E9F12.2.10.5	+++	ND	ND	ND	12065	
	155.2C2E9F12.2.10.6	+/-	ND	ND	ND	12066	
	166.5E6G12.1	+++	ND	ND	ND	12069	
166.5E6_	166.5E6G12.3	+++	ND	ND	ND	12070	
	166.5E6G12.4	+++	+	ND	ND	12071	
177.8C10	177.8C10B3H9	+++	++	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.5	++	ND	ND	ND	ND	
183.4B3	183.4B3E11.6.1.9	++	ND	ND	ND	ND	
	183.4B3E11.6.1.10	+++	++	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.7	+++	+/-	ND	ND	ND	
183.2G5	183.2G5D2.8.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	183.2G5D2.8.9	+++	ND	ND	ND	ND	
	184.6C11D3.2	++	ND	ND	ND	12078	
184.6C11	184.6C11D3.3	++	ND	ND	ND	12080	
	184.6C11D3.6	+/-	+/-	ND	ND	12079	
	185.3E4F12.5.6	444	ND	ND	ND	12072	
185.3E4_	185.3E4F12.5.11	+++	ND	ND	ND	12073	
	185.3E4F12.5.12	+++	+	ND	ND	12074	
	185.1A9E9.6.1	+	ND	ND	ND	ND	
185.1A9	185.1A9E9.6.6	+++	+++	+	ND	ND	
	185.9F11E10.3B5.1	+++	ND	ND	ND	ND	
185.9F11	185.9F11E10.3B5.8	+++	ND	ND	ND	ND	
	185.9F11E103B5.12	+++	+++	ND	ND	ND	
Clones from 7 mother hybridomas were identified to have antagonist activity. Based on their relative antagonist potency and ADCC activities, two hybridoma clones were selected. Their names are: 131.2F8.5.9 (5.9) and 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12).							

Os clones de 7 outros hibridomas foram identificados como possuindo atividade antagonista (Tabela 2 acima). Com base na sua potência antagonista relativa e atividades ADCC, dois clones de hibridomas foram selecionados para uma avaliação mais aprofundada. Eles são nomeados 131.2F8.5.9 (5,9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (12.12). O perfil de ligação destes dois anticorpos para a linha celular do linfoma CD40+ é mostrado como um histograma de citometria de fluxo na Figura 1.

Exemplo 2: Sequências polinucleotídicas de aminoácidos e de anticorpos humanos anti-CD40

Os cADNs que codificam as regiões variáveis dos anticorpos candidatos foram amplificados por PCR, clonados e sequenciados. As sequências de aminoácidos para a cadeia leve e da cadeia pesada do anticorpo CHIR-12.12 são apresentadas nas Figuras 9A e 9B, respectivamente. Ver também SEQ ID N°: 2 (cadeia leve para o mAb CHIR-12.12), e SEQ ID N°: 4 (cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12). Uma variante da cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12 é mostrada na Figura 9B (ver também SEQ ID N°: 5), que difere da SEQ ID N°: 4, em que tem um resíduo de serina substituída pelo resíduo de alanina na posição 153 da SEQ ID N°: 4. As sequências de nucleótidos que codificam a cadeia leve e a cadeia pesada do anticorpo CHIR-12.12 são apresentadas nas Figuras 10A e 10B, respectivamente. Ver também SEQ ID N°: 1 (sequência de codificação da cadeia leve para o mAb CHIR-12.12), e SEQ ID N°: 3 (sequência de codificação da cadeia pesada para o mAb CHIR-12.12). As sequências de aminoácidos para a cadeia leve e a cadeia pesada do anticorpo CHIR-5.9 são apresentadas nas Figuras 11A e 11B, respectivamente. Veja também a SEQ ID N°: 6 (cadeia leve para mAb CHIR-5.9) e SEQ ID N°: 7 (cadeia pesada para mAb CHIR-5.9). Uma variante da cadeia pesada para o mAb CHIR-5.9 é apresentada na Figura 11B (ver também a SEQ ID N°: 8), que difere da SEQ ID N°: 7 em que tem um resíduo de serina substituído pelo resíduo de alanina na posição 158 da SEQ ID N°: 7.

Tal como esperado para os anticorpos derivados de hibridomas independentes, existe uma variação considerável nas sequências de nucleótidos das regiões determinantes de complementaridade (CDRs). A diversidade de V_H na região

CDR3 é acreditado determinar de forma mais significativa a especificidade do anticorpo.

Exemplo 3: Efeito de CHIR-5.9 e CHIR-12.12 sobre a interação CD40/CD40L in vitro

Os anticorpos candidatos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 impedem a ligação do ligando CD40 na superfície celular CD40 e deslocam o ligando CD40 pré-ligado. Os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 foram testados quanto à sua capacidade para impedir a ligação do ligando CD40 para CD40 sobre a superfície de uma linha celular de linfoma (Ramos). A ligação de ambos os anticorpos (não marcados) impediu a subsequente ligação do ligando PE-CD40 tal como medido por ensaios de citometria de fluxo (Figura 2A). Numa segunda série de ensaios os dois anticorpos foram testados quanto à sua capacidade para substituir o ligando CD40 pré-ligado à superfície das células CD40. Ambos os anticorpos foram eficientes para competir com o ligando CD40 pré-ligado, com o CHIR-5.9 a ser ligeiramente mais eficaz do que CHIR-12.12 (Figura 2B).

Exemplo 4: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 ligados a um epítopo diferente em CD40 do que 15B8

Os anticorpos monoclonais candidatos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 competem uns com os outros para a ligação com CD40, mas não com 15B8, uma IgG₂ anti-CD40 mAb (ver WO 02/28904). Estudos de ligação à competição de anticorpos usando Biacore foram concebidos utilizando chips de biossensor CM5 com proteína A imobilizada através de acoplamento de amina, o qual foi utilizado para capturar tanto o anti-CD40, como CHIR-12.12 ou 15B8. As curvas de ligação normais de associação/dissociação são observadas com concentrações variadas de CD40-his (dados não mostrados). Para estudos

de competição, tanto CHIR-12.12 como 15B8 foram capturados sobre a proteína A de superfície. Subsequentemente um complexo Fab de CD40-his/CHIR-5.9 (100 nM CD40: 1 μ M CHIR-5.9.Fab), em várias concentrações, foi vertido sobre a superfície modificada. No caso de CHIR-12.12, não houve associação do complexo observado, indicando que CHIR-5.9 bloqueia a ligação de CHTR-12.12 ao CD40-his. Para 15B8, associação do complexo Fab CHIR-5.9 foi observado indicando que o CHIR-5.9 não bloqueia a ligação de 15B8 para o sítio de ligação CD40. No entanto, a taxa de dissociação do complexo aumentou de forma dramática (dados não mostrados).

Também foi determinado que 15B8 e CHIR-12.12 não competem para a ligação de CD40. Esta experiência foi realizada capturando CHIR-12.12 no chip biossensor de proteína A, bloqueando os sítios da proteína A residual com o controle hIgG₁, ligação ao CD40-his e, em seguida, fluindo o 15B8 sobre a superfície modificada. O 15B8 liga-se nessas condições, indicando que CHIR-12.12 não bloqueia o 15B8 de ligação ao CD40.

Exemplo 5: Propriedades de ligação de hibridomas selecionados

A proteína A foi imobilizada em chips de biossensor CM5 por acoplamento de amina. Os anticorpos monoclonais anti-CD40 humano, a 1,5 μ g/ml, foram capturados na superfície do biossensor modificado durante 1,5 minutos a 10 μ l/min. O CD40 recombinante solúvel fluíu sobre a superfície do biossensor em diferentes concentrações. O anticorpo e o antígeno foram diluídos em 0,01 M de HEPES, pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005% de agente tensioativo P20 (HBS-EP). As constantes cinéticas e de afinidade foram

determinadas usando o software Biaevaluation com um modelo de interação/ajuste global 1:1.

Como mostrado na Tabela 3 abaixo, há uma diferença de 121 vezes na taxa de desconto de CHIR-5.9 e CHIR-12.12, resultando em 24 vezes maior afinidade para CHIR-12.12.

<u>Anticorpo</u>	Ka (M⁻¹ seg⁻¹)	Kd (seg⁻¹)	KD (nM)
Anti-CD40, CHIR-5.9	$(12,35 \pm 0,64) \times 10^5$	$(15,0 \pm 1,3) \times 10^{-3}$	12,15 $\pm$ 0,35
Anti-CD40, CHIR-12.12	$(2,41 \pm 0,13) \times 10^5$	$(1,24 \pm 0,06) \times 10^{-4}$	0,51 $\pm$ 0,02

Exemplo 6: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 são potentes antagonistas para a proliferação mediada por CD40 de linfócitos humanos de indivíduos normais

Engajamento do CD40 pelo ligando CD40 induz a proliferação de células B humanas. Um anticorpo antagonista anti-CD40, é esperado inibir esta proliferação. Dois anticorpos candidatos (CHIR-5.9 e CHIR-12.12) foram testados quanto à sua capacidade para inibir a proliferação de PBMC induzida pelo ligando de CD40 em sujeitos humanos normais. As células CHO fixadas em formaldeído transfectante que expressam o ligando de CD40 (CD40L) foram usadas como uma fonte de ligando de CD40. Os PBMC humanos foram cultivados durante 4 dias com as células CHO fixadas em formaldeído que expressam o ligando CD40 na presença de concentrações variáveis de anti-CD40 mAb CHIR-5.9 ou CHIR-12.12. A proliferação foi medida por incorporação de timidina tritiada. As células foram pulsadas com timidina tritiada marcado a 37°C durante 14-18 horas.

Ambos os anticorpos mostraram-se muito eficazes para inibir a proliferação de PBMC humano induzida pelo ligando de CD40

(Tabela 4A, mAb CHIR-5.9, Tabela 4B, mAb CHIR-12.12). A experiência foi realizada com vários doadores de PBMC ($n = 12$ para CHIR-5.9 e $n = 2$ para CHIR-12.12), para assegurar que a inibição observada não foi uma peculiaridade de células a partir de um único doador. O seguimento das avaliações com quatro doadores adicionais de PBMC foi realizado para mAb CHIR-12.12 com tendências semelhantes observadas. Uma vasta gama de concentrações de anticorpos (0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$) foi utilizada nestes ensaios. A quase completa inibição da proliferação induzida pelo ligando de CD40 poderia ser conseguida a 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de concentração de anticorpos na maioria dos casos. A concentração de anticorpo (pM) para inibir 50% de proliferação de linfócitos induzida pelo ligando CD40 (IC₅₀) para linfócitos de 6 doadores resultou numa média de IC₅₀ (pM) de 47 (SD = 21; doador 1, 24; doador 2, 66; doador 3, 45; doador 4, 84; doador 5, 30; doador 6, 35), que se compara favoravelmente com a média de IC₅₀ (pM) de 49,65 mostrada na Tabela 4B. Com base no conjunto de dados atuais, ambos os anticorpos candidatos parecem semelhantes na sua potência para a inibição da proliferação de PBMC normal induzida pelo ligando de CD40.

Tabela 4A. Efeito de mAb CHIR-5.9 em proliferação de PBMC induzida por CD40L

Exp#		PBMC alone	CHO-CD40L alone	PBMC+ CHO-CD40L	Abs Conc (µg/ml)	hulG1		CHIR-5.9	
						CPM	% of inhibition	CPM	% of inhibition
PBMC-010		1851	121	4436	1	5080	-26	2622	74
		1851	121	4436	0.25	5498	-43	2907	62
		1851	121	4436	0.0625	6029	-65	2619	74
		1851	121	4436	0.0156	5814	-56	1199	131
PBMC-011	Donor#1	2162	178	8222	10	13137	-84	2252	101
		2162	178	8222	1	11785	-61	1438	115
		2162	178	8222	0.1	10758	-43	1249	119
		2162	178	8222	0.01	11322	-53	4705	60
	Donor#2	2216	294	7873	10	16679	-164	2362	103
		2216	294	7873	1	14148	-117	1202	124
		2216	294	7873	0.1	12422	-85	756	133
		2216	294	7873	0.01	13870	-112	6606	24
	Donor#3	2396	241	11021	10	11641	-7	2631	100
		2396	241	11021	1	13528	-30	1450	114
		2396	241	11021	0.1	12176	-14	990	120
		2396	241	11021	0.01	11895	-10	5357	68
	Donor#4	4552	133	15301	10	22098	-64	3768	109
		4552	133	15301	1	19448	-39	2040	125
		4552	133	15301	0.1	18398	-29	1728	128

Exp#		PBMC alone	CHO-CD40L alone	PBMC+ CHO-CD40L	Abs Conc ($\mu\text{g/ml}$)	hulgG1		CHIR-5.9	
						CPM	% of inhibition	CPM	% of inhibition
		4552	133	15301	0.01	22767	-70	9481	55
PBMC-012		777	117	6041	10	7327	-25	2150	76
		777	117	6041	1	6212	-3	1550	87
		777	117	6041	0.1	7006	-19	828	101
		777	117	6041	0.01	7524	-29	1213	94
PBMC-014		1857	73	7889	100	9399	-25	3379	76
		1857	73	7889	20	8120	-4	3870	67
		1857	73	7889	4	8368	-8	2552	90
		1857	73	7889	0.8	9564	-28	1725	103
PBMC-015	Donor#1	3203	127	10485	100	15425	-69	1497	126
		3203	127	10485	20	11497	-14	1611	124
		3203	127	10485	4	11641	-16	1359	128
		3203	127	10485	0.8	12807	-32	1490	126
	Donor#2	3680	175	15145	100	21432	-56	1792	118
		3680	175	15145	20	16998	-16	1779	118
		3680	175	15145	4	17729	-23	1965	117
		3680	175	15145	0.8	17245	-19	2217	115
	Donor#3	2734	152	19775	100	22967	-19	1664	107
		2734	152	19775	20	21224	-9	1848	106
		2734	152	19775	4	20658	-5	1534	108
		2734	152	19775	0.8	18923	5	1262	110
PBMC-016		1118	36	13531	0.1	10928	21	745	103
		1118	36	13531	0.05	11467	17	962	102
		1118	36	13531	0.01	11942	13	3013	85
PBMC-017		962	75	12510	1	13597	-9	258	107
Average % inhibition of human PBMC at 100 $\mu\text{g/ml}$								-42	107
Average % inhibition of human PBMC at 10 $\mu\text{g/ml}$								-69	98

Exp#	PBMC alone	CHO- CD40L alone	PBMC+ CHO- CD40L	Abs Conc (μ g/ml)	huIgG1 % of inhibition CPM	CHIR-5.9 % of inhibition CPM
Average % inhibition of human PBMC at 1 μ g/ml						-41 107
Average % inhibition of human PBMC at 0.1 μ g/ml						-28 117
Average % inhibition of human PBMC at 0.01 μ g/ml						-44 64
Average % inhibition of human PBMC						-35 101
% of inhibition: $100 - (\text{CPM with Abs-PBMC alone} - \text{CHO-CD40L alone}) / (\text{CPM of PBMC+CHO-CD40L-PBMC alone} - \text{CHO-CD40L alone}) * 100\%$						

Table 4B. Effect of mAb Ch0ir-12.12 on CD40L-induced PBMC proliferation.									
Exp#		CHO-CD40L		Abs Conc (μ g/ml)	HulG1		CHIR-12.12		
		PBMC alone	PBMC+ CHO-CD40L alone		CPM	of inhibition	CPM	% of inhibition	IC50(nM)
PBMC-025	Donor#1	4051	32	42292	33354	23	440	110	
		4051	32	42292	37129	14	8696	88	
		4051	32	42292	40271	5	32875	25	
		4051	32	42292	40034	6	37261	13	24.22
	Donor#2	2260	31	14987	15767	-6	365	115	
		2260	31	14987	17134	-17	6734	65	
		2260	31	14987	20142	-41	16183	-9	
		2260	31	14987	17847	-23	16187	-9	65.96
	Donor#1	2039	35	19071	17136	11	624	109	
		2039	35	19071	16445	15	6455	74	
		2039	35	19071	16195	17	17833	7	
		2039	35	19071	18192	5	17924	7	45
	Donor#2	2016	64	17834	17181	4	2078	100	
		2016	64	17834	16757	7	10946	44	
		2016	64	17834	18613	-5	17924	-1	
		2016	64	17834	17169	4	18569	-5	84
PBMC-028	Donor#1	4288	45	22547	18204	24	2098	112	
		4288	45	22547	20679	10	1827	114	
		4288	45	22547	22799	-1	6520	88	
		4288	45	22547	23547	-5	22327	1	
	Donor#2	4288	45	22547	24778	-12	24124	-9	30.07
		2148	58	54894	48545	12	5199	94	
		2148	58	54894	45708	17	5091	95	
		2148	58	54894	51741	6	18890	68	
		2148	58	54894	52421	5	50978	7	
		2148	58	54894	54778	0	52581	4	34.68
PBMC-029	Donor#1	609	69	10054	11027	-10	2098	85	
		609	69	10054	10037	0	1827	88	

Table 4B. Effect of mAb Chohr-12.12 on CD40L-induced PBMC proliferation.									
Exp#	PBMC alone	CHO-CD40L alone	PBMC+ CHO-CD40L	Abs Conc (μg/ml)	HuIgG1		CHIR-12.12		
					CPM	of inhibition	CPM	% of inhibition	IC50(nM)
	609	69	10054	0.001	10222	-2	6520	38	28.06
	609	69	10054	0.0001	11267	-13	22327	-131	
	7737	57	23132	0.1	21254	12	2536	134	
	7737	57	23132	0.01	21726	9	10249	84	
	7737	57	23132	0.001	22579	4	23380	-2	55.35
	7737	57	23132	0.0001	22491	4	23183	0	
	2739	47	53426	0.1	60116	-13	2132	101	
	2739	47	53426	0.01	56411	-6	14297	77	
	2739	47	53426	0.001	59167	-11	55868	-5	35.52
	2739	47	53426	0.0001	59290	-12	60865	-15	
	4310	50	53781	0.1	52881	2	3208	102	
	4310	50	53781	0.01	51741	4	30716	47	
	4310	50	53781	0.001	53072	1	53628	0	102.88
	4310	50	53781	0.0001	58045	-9	54343	-1	
	2458	42	14058	0.1	16579	-22	636	116	
	2458	42	14058	0.01	19250	-45	3358	93	
	2458	42	14058	0.001	19852	-50	20639	-57	49.65
	2458	42	14058	0.0001	19161	-44	18907	-42	
	Average % inhibition of human PBMC at 0.1 μg/ml				3			107	
	Average % inhibition of human PBMC at 0.01 μg/ml				-1			74	
	Average % inhibition of human PBMC at 0.001 μg/ml				-7			0	49.65
	Average % inhibition of human PBMC at 0.0001 μg/ml				-8			-17	
% of inhibition: 100-(CPM with Abs-PBMC alone-CHO-CD40L alone)/(CPM of PBMC+CHO-CD40L-PBMC alone-CHO-CD40L alone)*100%									

Em

Em adição às células B, os PBMC humanos também conter células assassinas naturais que podem mediar a citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC). Para clarificar o mecanismo de inibição da proliferação mediada pelo anticorpo, os ensaios foram realizados com células B purificadas a partir de PBMC humanos. Semelhante aos resultados obtidos com PBMC, ambos os anticorpos inibiram potencialmente a proliferação de células B purificadas induzida pelo ligando CD40 (Tabela 5, n = 3). Estes dados demonstram que a atividade antagonista dos anticorpos candidatos, e não o mecanismo de ADCC, é a causa da inibição da proliferação nestes ensaios.

Table 5. Effect of anti-CD40 antibodies on CD40 ligand-induced proliferation of purified human B cells

Exp#	Donor #	CPM			Abs Conc (µg/ml)	HulG1		CHIR-5.9		CHIR-12.12	
		B cells	CHO-CD40L	B. cells + CHO- CD40L		CPM	% Inhibition	CPM	% Inhibition	CPM	% Inhibition
B cell-004	1	418	89	3132	100	429	103	271	109	152	114
		418	89	3132	20	3193	-2	316	107	222	111
		418	89	3132	4	3175	-2	144	114	235	110
		418	89	3132	0.8	6334	-122	245	110	63	117
	2	81	73	27240	100	28311	-4	85	100	77	100
		81	73	27240	20	24707	9	65	100	94	100
		81	73	27240	4	23081	15	108	100	68	100
		81	73	27240	0.8	26252	4	87	100	77	100
B cell-005	3	267	75	24552	1	25910	-6	291	100	102	101
		267	75	24552	0.1	28447	-16	259	100	108	101
		267	75	24552	0.01	26706	-9	2957	89	4922	81
Average % Inhibition											
		% of Inhibition: 100-(CPM with Abs-B cells alone-CHO-CD40L alone)/(CPM of B cell with CHO-CD40L cells alone-CHO-CD40L alone)* 100%									

Exemplo 7: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 não induzem fortemente a proliferação de células B humanas de indivíduos normais

O ligando de CD40 ativa as células B normais e a proliferar as células de linfoma de células B. A ligação de alguns anticorpos anti-CD40 (agonista), pode proporcionar um sinal estimulante semelhante para a proliferação de células B normais e cancerosas. Os anticorpos com forte atividade estimuladora de células B não são candidatos adequados para o tratamento terapêutico de linfomas de células B. Os dois anticorpos candidatos foram testados quanto à sua capacidade para induzir a proliferação de células B a partir de dadores voluntários normais. As células B purificadas por gradiente de centrifugação Ficoll-Hypaque Plus de dador normal de PBMC foram cultivadas em placas de 96 poços, com várias concentrações de anticorpos candidatos (gama entre 0,001 a 100 µg/ml) durante um total de 4 dias. No grupo de controlo positivo, PBMC foram cultivados com células CHO fixadas em formaldeído que expressam o ligando de CD40. A proliferação de células B foi medida pela incorporação de timidina tritiada marcada a 37°C durante 14-18 horas. Enquanto o ligando CD40 presente nas células CHO induziu proliferação enérgica das células B, resultando num índice médio de estimulação (SI) de 145, os anticorpos candidatos induziram apenas uma proliferação fraca com um índice de estimulação de 2,89 e 5,08 para CHIR-12.12 e CHIR-5.9, respectivamente (n = 3) (Tabela 6).

**Tabela 6. Proliferação de células B purificadas a partir de
sujeitos humanos normais em resposta a mAbs anti-CD40
candidatos**

Exp#	Donor#	B cells	B cells+CHO-CD40L		Abs conc (µg/ml)	B cells+hulpGI		B cells+CHIR-5.9		B cells+CHIR-12.12	
		CPM	CPM	S. index (1)		CPM	S. index (2)	CPM	S. index (2)	CPM	S. index (2)
B cell-004	1	418	3132	7.49	100	498	1.19	401	0.96	458	1.10
Frozen		418	3132		20	245	0.59	232	0.56	370	0.89
		418	3132		4	241	0.58	232	0.56	211	0.50
		418	3132		0.8	376	0.90	298	0.71	230	0.55
Frozen	2	81	27240	336.30	100	34	0.42	454	5.60	122	1.51
		81	27240		20	48	0.59	706	8.72	255	3.15
		81	27240		4	41	0.51	567	7.00	367	4.53
		81	27240		0.8	34	0.42	736	9.09	408	5.04
B cell-005	3	267	24552	91.96	1	691	2.59	2101	7.87	1223	4.58
		267	24552		0.1	686	2.57	2267	8.49	1557	5.83
		267	24552		0.01	808	3.03	2203	8.25	1027	3.85
		267	24552		0.001	567	2.12	846	3.17	826	3.09
Average Stimulation Index (SI) 145.25							1.29		5.08		2.88
S. index(1): = CPM (B cells+CHO-CD40L)/CPM (B cells alone)											
S. index(2): = CPM (B cells+Abs)/CPM (PBMC alone)											

Em adição às células B, foram providenciados PBMC humanos contendo tipos de células que contêm receptores Fc (FcR) para moléculas de IgG1 que podem proporcionar reticulação de anticorpos anti-CD40 ligados a CD40 nas células B. Esta reticulação pode aumentar potencialmente a atividade estimuladora de anticorpos anti-CD40. Para confirmar a ausência de atividade estimuladora de células B dos anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 na presença de células reticuladas, foram realizados ensaios de proliferação com PBMC total contendo células B, assim como células FcR+. Os dados destas experiências (Tabela 7A, mAb CHIR-5.9; Tabela 7B, mAb CHIR-12.12) confirmam que estes anticorpos candidatos, mesmo na presença de células portadoras de FcR não estimulam, em geral, a proliferação de células B ao longo da proliferação induzida por IgG1 humana de controle (n = 10). O ligante CD40 induziu um índice de estimulação

médio (SI) SI de 7,41. O SI médio com os anticorpos candidatos foi de 0,55 e 1,05 para CHIR-12.12 e CHIR-5.9, respectivamente. Apenas um dos 10 dadores de PBMC testadas mostraram alguma resposta estimuladora do anticorpo CHIR-5.9 (dador # 2 na Tabela 7). A falta de atividade estimuladora pelo mAb candidatos foi ainda confirmada através da medição da proliferação de PBMC em resposta a anticorpos candidatos anti-CD40 imobilizados sobre a superfície de plástico dos poços de cultura (n = 2). O SI de estimulação média com ligando de CD40, CHIR-12.12 e CHIR-5.9 foram 22, 0,67 e 1,2, respectivamente (Tabela 8). Em conjunto, estes dados mostram que os anticorpos antiCD40 candidatos não possuem fortes propriedades estimulantes das células B.

Tabela 7A. Proliferação de PMBC a partir de sujeitos humanos em resposta ao mAb CHIR-5.9

Exp#		PBM C	PBMC+CHO- CD40L		Abs conc (μ g/ml)	PBMC+huIgG1		PBMC+CHIR-5.9	
			CPM	index (1)		CPM	index (2)	(CP M	index(2)
PBMC- 010		1417	5279	3.73	1	1218	0.86	597 3	4.22
		1417	5279		0.25	1712	1.21	481 5	3.40
		1417	5279		0.062 5	1449	1.02	364 2	2.57
		1417	5279		0.015 6	1194	0.84	324 2	2.29
PBMC- 011	Donor#1	2138	8247	3.86	10	3047	1.43	317 7	1.49
		2138	8247		1	2726	1.28	361 7	1.69
		2138	8247		0.1	2026	0.95	201 1	0.94
		2138	8247		0.01	2424	1.13	186 0	0.87
	Donor#2	2374	1156 1	4.87	10	4966	2.09	452 3	1.91
		2374	1156 1		1	2544	1.07	244 5	1.03
		2374	1156 1		0.1	2177	0.92	146 2	0.62
		2374	1156 1		0.01	4672	1.97	189 6	0.80
	Donor#3	3229	7956	2.46	10	5035	1.56	211 9	0.66
		3229	7956		1	2826	0.88	109 9	0.34
		3229	7956		0.1	2277	0.71	105 2	0.33
		3229	7956		0.01	3078	0.95	189 9.	0.59
	Donor#4	4198	1431 4	3.41	10	5012	1.19	517 6	1.23
		4198	1431 4		1	3592	0.86	470 2	1.12
		4198	1431 4		0.1	5298	1.26	431 9	1.03
		4198	1431 4		0.01	5758	1.37	540 0	1.29
PBMC- 014		2350	8787	3.74	100	2722	1.16	247 1	1.05
		2350	8787		20	2315	0.99	244 7	1.04
		2350	8787		4	2160	0.92	165 9	0.71
		2350	8787		0.8	2328	0.99	167 1	0.71
PBMC- 015	Donor#1	3284	1293 6	3.94	100	3598	1.10	168 2	0.51
		3284	1293 6		20	2751	0.84	156 2	0.48
		3284	1293 6		4	3135	0.95	110 5	0.34
		3284	1293 6		0.8	4027	1.23	141 9	0.43
	Donor#2	6099	1912 1	3.14	100	2999	0.49	510 4	0.84
		6099	1912 1		20	4025	0.66	391 7	0.64
		6099	1912 1		4	4496	0.74	334 1	0.55
		6099	1912 1		0.8	3834	0.63	413 9	0.68
	Donor#3	2479	1982 6	8.00	100	3564	1.44	120 4	0.49
		2479	1982 6		20	1874	0.76	782	0.32
		2479	1982 6		4	1779	0.72	634	0.26
		2479	1982 6		0.8	2274	0.92	937	0.38
PBMC- 016		1148	1578 9	13.75	0.1	1255	1.09	103 6	0.90
		1148	1578 9		0.05	1284	1.12	871	0.76
		1148	1578 9		0.01	1446	1.26	952	0.83

Exp#		PBM C	PBMC+CHO- CD40L		Abs conc (μ g/ml 1)	PBMC+hulG1		PBMC+CHIR-5.9	
			CPM	index (1)		CPM	index 2)	(CP M	index(2)
Average SI of PBMC			5.09			1.06		1.03	
index(1): =(PBMC+CHO-CD40L)/PBMC									
index(2): =(PBMC+Abs)/PBMC									

Tabela 7B. Proliferação de PMBC a partir de sujeitos humanos em resposta ao mAb CHIR-12.12

Exp#		PBMC	PBMC+CHO- CD40L		Abs conc (μ g/ml)	PBMC+hulG1		PBMC+CHIR-12.12	
			CPM	index (1)		CPM	index(2)	CPM	index (2)
PBMC-025	Donor#1	4051	42292	10.44	0.1	2909	0.72	2451	0.61
		4051	42292		0.01	4725	1.17	8924	2.20
		4051	42292		0.001	8080	1.99	8782	2.17
		4051	42292		0.0001	4351	1.07	4342	1.07
	Donor#2	2260	14987	6.63	0.1	2538	1.12	6741	2.98
		2260	14987		0.01	3524	1.56	8921	3.95
		2260	14987		0.001	3159	1.40	4484	1.98
		2260	14987		0.0001	2801	1.24	2533	1.12
PBMC-026	Donor#1	2085	18313	8.78	0.1	1386	0.66	2761	1.32
		2085	18313		0.01	2871	1.38	3162	1.52
		2085	18313		0.001	2602	1.25	3233	1.55
		2085	18313		0.0001	1709	0.82	1766	0.85
	Donor#2	676	18054	26.71	0.1	660	0.98	2229	3.30
		676	18054		0.01	2864	4.24	1238	1.83
		676	18054		0.001	693	1.03	1507	2.23
		676	18054		0.0001	984	1.46	811	1.20
PBMC-027	Donor#1	2742	13028	4.75	0.1	4725	1.72	2795	1.02
		2742	13028		0.01	4575	1.67	5353	1.95
		2742	13028		0.001	3218	1.17	3501	1.28
		2742	13028		0.0001	5107	1.86	4272	1.56
	Donor#2	1338	11901	8.89	0.1	1633	1.22	1943	1.45
		1338	11901		0.01	1520	1.14	5132	3.84
		1338	11901		0.001	1517	1.13	2067	1.54
		1338	11901		0.0001	1047	0.78	2076	1.55
PBMC-028	Donor#1	4288	22547	5.26	0.1	3686	0.86	2525	0.59
		4288	22547		0.01	3113	0.73	2047	0.48
		4288	22547		0.001	4414	1.03	3515	0.82
		4288	22547		0.0001	2452	0.57	4189	0.98
	Donor#2	2148	54894	25.56	0.1	9127	4.25	5574	2.59
		2148	54894		0.01	4566	2.13	6515	3.03

Exp#		PBMC	PBMC+CHO-CD40L		Abs conc (μ g/ml)	PBMC+hulG1		PBMC+CHIR-12.12	
			CPM	Index (1)		CPM	index(2)	CPM	index (2)
		2148	54894		0.001	5285	2.46	5919	2.76
		2148	54894		0.0001	4667	2.17	4298	2.00
PBMC-029	Donor#1	609	10054	16.51	0.1	359	0.59	363	0.60
		609	10054		0.01	473	0.78	956	1.57
		609	10054		0.001	461	0.76	1159	1.90
		609	10054		0.0001	625	1.03	558	0.92
	Donor#2	7737	23132	2.99	0.1	4940	0.64	3493	0.45
		7737	23132		0.01	6041	0.78	3644	0.47
		7737	23132		0.001	5098	0.66	5232	0.68
		7737	23132		0.0001	5135	0.66	5241	0.68
PBMC-030	Donor#1	4164	57205	13.74	10	2713	0.65	1046	0.25
		4164	57205		1	3627	0.87	1576	0.38
		4164	57205		0.1	4590	1.10	1512	0.36
		4164	57205		0.01	4384	1.05	2711	0.85
	Donor#2	3324	53865	16.20	10	6376	1.92	4731	1.42
		3324	53865		1	4720	1.42	5219	1.57
		3324	53865		0.1	3880	1.17	5869	1.77
		3324	53865		0.01	3863	1.16	5657	1.70
PBMC-032	Donor#1	1808	15271	8.45	10	2349	1.30	4790	2.65
		1808	15271		1	3820	2.11	5203	2.88
		1808	15271		0.1	2098	1.16	6332	3.50
		1808	15271		0.01	1789	0.99	5005	2.77
Average SI of PBMC				11.92			1.30		1.62
index(1): =CPM of (PBMC+CHO-CD40L)/CPM of PBMC									
index(2): =CPM of (PBMC+Abs)/CPM of PBMC									

Table 8. Proliferation of PBMC from normal human subjects in response to immobilized anti-CD40 antibodies

Exp#	PBMC		PBMC+CHO-CD40L		Abs conc (ug/ml)	PBMC+hulG1		PBMC+CHIR-5.9		PBMC+CHIR-12.12	
	CPM		CPM	S.index (1)		CPM	S.index (2)	CPM	S.index (2)	CPM	S.index (2)
PBMC-012	225		6808	30.26	10	279	1.24	734	3.26	200	0.89
	225		6808		1	175	0.78	178	0.79	161	0.72
	225		6808		0.1	156	0.69	226	1.00	249	1.11
	225		6808		0.01	293	1.30	232	1.03	254	1.13
immoblize-004	857		11701	13.65	1000	479	0.56	1428	1.67	384	0.45
	857		11701		100	543	0.63	839	0.98	265	0.31
	857		11701		10	487	0.57	411	0.48	262	0.31
	857		11701		1	632	0.74	372	0.43	376	0.44
Average Stimulation Index		21.96				0.81			1.21		0.67
S. index (1): =CPM (PBMC+CHO-CD40L)/CPM (PBMC)											
S. index (2): = CPM (PBMC+mAbs)/CPM (PBMC)											

Exemplo 8: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 são capazes de matar células alvo portadoras de CD40 por ADCC

Os anticorpos candidatos podem matar células alvo portadoras de CD40 (linhas de linfoma) pelo mecanismo de ADCC. Tanto CHIR-5.9 e CHIR-12.12 são anticorpos inteiramente humanos do isotipo IgG1 e espera-se ter a capacidade de induzir a morte de células alvo pelo mecanismo de ADCC. Foram testados quanto à sua capacidade de matar as linhagens de células cancerosas *em ensaios in vitro*. Duas linhas de células de linfoma humano (Ramos e Daudi) foram selecionadas como células-alvo para estes ensaios. PBMC ou células NK enriquecidas a partir de 8 dadores voluntários normais foram utilizados como células efectoras nestes ensaios. Uma resposta ADCC mais potente foi observada com CHIR-12.12 comparada com CHIR-5.9 contra ambas as células-alvo da linha de células de linfoma. As linhas de células de linfoma também expressam CD20, o antigénio alvo para o rituximab (Rituxan®), o que permitiu a comparação da atividade ADCC destes dois mAbs candidatos com a atividade ADCC do rituximab. Para a linha celular de linfoma alvo, observou-se uma lise específica média de 35%, 59% e 47% para CHIR-5.9, CHIR-12.12 e rituximab, respectivamente, quando utilizado a 1 µg/ml de concentração (Tabela 9). Os dois anticorpos não mostraram muita atividade em ensaios de citotoxicidade dependente de complemento (CDC).

Tabela 9. Morte de mAb anti-CD40 dependente de ADCC nas linhas celulares de linfoma

Anti-CD40 mAb dependent killing of lymphoma cell lines by ADCC										
Exp#	Effector cell	E:T ratio	Target cells: Human lymphoma cell line (Ramos or Daudi)							
			% lysis IgG1	Abs conc (µg/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
					% lysis	% lysis- % lysis IgG1	% lysis	% lysis- % lysis IgG1	% lysis	% lysis- % lysis IgG1
ADCC-005	huNK	3	17.05	5	30.75	13.70	65.22	48.17	ND	ND
Alarmor Blue	huNK	3	40.81	5	58.62	17.81	87.87	47.06	ND	ND
ADCC-006	huNK	2	-3.09	10	3.50	6.59	43.71	46.8	34.82	37.91
Alarmor Blue			-8.62	1	-10.10	-1.48	45.13	53.75	37.07	45.69
			-11	0.1	-14.80	-3.80	39.82	50.82	33.81	44.61
			-4.54	0.01	2.53	7.07	50.07	54.61	28.49	33.03
51Cr	huNK	5	1.5	10	32.09	30.59	47.24	45.742	ND	ND
			2.4	1	18.01	15.61	37.42	35.022	ND	ND
			2.5	0.1	14.67	12.17	37.63	35.131	ND	ND
ADCC-009	huNK	10	2.32	5	66.20	63.88	97.70	95.38	86.2	83.88
Calcein AM			0.48	1	67.20	66.72	123.00	122.52	88.2	87.72
			-1.43	0.2	78.40	79.83	118.00	119.43	88.8	90.23
			3.39	0.04	69.10	65.71	109.00	105.61	84.9	81.51
ADCC-011	huNK	8	3.18	1	15.36	12.19	51.59	48.42	22.44	19.27
Calcein AM			4.58	0.01	7.39	2.81	46.80	42.22	14.68	10.10
			5.41	0.002	6.35	0.94	5.10	-0.31	9.58	4.16
			7.03	0.0004	7.76	0.73	5.99	-1.04	5.99	-1.04

Anti-CD40 mAb dependent killing of lymphoma cell lines by ADCC										
Exp#	Effector cell	E:T ratio	Target cells: Human lymphoma cell line (Ramos or Daudi)							
			% lysis IgG1	Abs conc (µg/ml)	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituxan	
					% lysis	% lysis- % lysis IgG1	% lysis	% lysis- % lysis IgG1	% lysis	% lysis- % lysis IgG1
ADCC-012	huNK	10	13.34	10	73.31	59.97	117.80	104.46	50.75	37.41
Calcein AM			13.50	1	74.76	61.26	68.64	75.14	65.97	52.47
			12.27	0.01	58.52	46.25	72.88	60.61	50.16	37.89
			13.61	0.005	57.50	43.89	69.45	55.84	39.28	25.67
			11.95	0.001	56.81	44.86	65.17	53.22	33.07	21.12
ADCC-013	PBMC	100	2.54	1	21.03	18.49	37.94	35.40	32.28	29.74
51Cr			2.45	0.1	15.50	13.05	30.82	28.37	27.18	24.73
			2.92	0.01	14.53	11.61	22.59	19.67	12.79	9.87
			2.78	0.001	3.90	1.12	8.99	6.21	3.13	0.35
ADCC-014	PBMC	100	4.64	10	53.54	48.90	56.12	51.48	ND	ND
51Cr			4.64	1	46.84	42.20	43.00	38.36	ND	ND
			4.64	0.1	45.63	40.99	39.94	35.30	ND	ND
			4.64	0.01	7.73	3.09	9.79	5.15	ND	ND
			4.64	0.001	8.83	4.19	10.81	6.17	ND	ND
Average % lysis at 1 µg/ml concentration of mAbs						35.31		59.03		47.23
* The greater than 100% killing are due to incomplete killing by detergent used for 100% killing control.										

Exemplo 9: CD40 está presente na superfície das células NHL da biópsia de pacientes com linfonodo

Células NHL foram isoladas a partir de biópsias de nódulos linfáticos de pacientes e foram conservadas em azoto líquido até à sua utilização. A viabilidade celular no momento da análise excedia os 90%. As células de dois pacientes resistentes a rituximab três pacientes a rituximab (cinco no total) foram coradas quer com um 15B8-FITC marcado direto ou 15B8 mais anti-huIgG₂-FITC e analisadas por citometria de fluxo. As células NHL a partir de todos os pacientes foram localizadas para expressar CD40. A Tabela 10 mostra que uma média de 76% das células NHL expressa CD40 (uma gama de 60-91%).

Tabela 10

		% positivo ^c	
ID do paciente ^a	Tipo de paciente ^b	MS81 ^d	15B8 ^e
B	CR	n.d. ^f	91,02
J	CR	n.d.	60,36
H	NR	n.d.	85,08
H	NR	72,24	81,19
K	NR	n.d.	70,69
L	NR	n.d.	66,82
% média positiva		76	
^a pacientes NHL tratados com Mab anti-CD20			
^b resposta do paciente a mAb anti-CD20; CR=resposta completa; NR= não responderam			
^c % de células no quadro linfocítico que coraram positivamente			
^d MS81, agonista mAb anti-CD40			
^e 15B8, antagonista mAb anti-CD40			
^f n.d., não dado			

Exemplo 10: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 não estimulam a proliferação de células cancerosas a partir dos gânglios linfáticos de pacientes NHL

O ligando CD40 é conhecido por proporcionar um sinal estimulador para a sobrevivência e proliferação das células de linfoma de pacientes NHL. A ligação de alguns anticorpos anti-CD40 (agonista) pode proporcionar um sinal estimulador semelhante para a proliferação de células cancerígenas do

paciente. Os anticorpos com forte atividade estimuladora de células B não são candidatos adequados para o tratamento terapêutico de linfomas de células B. Os dois anticorpos candidatos foram testados quanto à sua capacidade para induzir a proliferação de células NHL em 3 pacientes. As células isoladas a partir de biopsias do nó de linfa (LN) foram cultivadas com várias concentrações de anticorpos candidatos (gama de 0,01 a 300 µg/ml) para um total de 3 dias. A proliferação celular foi medida por incorporação de timidina tritiada. Nenhum dos dois mAbs candidatos induziu a proliferação de células cancerosas, em qualquer das concentrações ensaiadas (Tabela 11). Os anticorpos, mesmo na presença de IL-4 exógena adicionada, um factor de crescimento de células B, não induziram a proliferação de células NHL (ensaiado nas células de 1 dos 3 pacientes). Estes resultados indicam que CHIR-5.9 e CHIR-12.12 não são anticorpos agonistas anti-CD40 e não estimulam a proliferação *in vitro* de células NHL dos pacientes.

Tabela 11. Proliferação de células cancerosas em pacientes LN de NHL em resposta a mAbs anti-CD4 candidatos

Donor#	Abs conc (ug/ml)	CPM		S. index	CPMcells + CHIR-12.12	S. index	CPM cells+MS81	S. index
		Cells + IgG1	cells + CHIR-5.9	CHIR-5.9		CHIR-12.12		MS81
PP	0.01	180	203	1.23	133.67	0.74	ND	ND
	0.1	107.5	151.67	1.41	136	1.27	ND	ND
	1	130.67	206.67	1.58	197.33	1.51	179	1.37
	10	152.5	245	1.61	137.33	0.90	871.67	5.71
	100	137.67	332.33	2.41	157.33	1.14	ND	ND
	300	137.67	254.33	1.85	100.67	0.73	ND	ND
MM	0.01	165	180.33	1.09	124	0.75	ND	ND
	0.1	180.5	149.67	0.83	111.33	0.62	ND	ND
	1	62	109.67	1.77	104.67	1.69	ND	ND
	10	91.5	93.33	1.02	100	1.09	763	8.34
	100	123	173	1.41	105.33	0.86	ND	ND
	300	109	183.67	1.69	157	1.44	ND	ND
BD (IL-4)	0.01	1591.5	1623.67	1.02	1422	0.89	ND	ND
	0.1	1405	1281	0.91	1316.33	0.94	ND	ND
	1	1526	1352.33	0.89	1160	0.76	1508.33	0.99
	10	1450	1424	0.98	1244	0.86	4146.67	2.86
	100	1406.67	1497.67	1.06	1255.33	0.89	ND	ND
	300	1410.33	1466.67	1.04	1233	0.87	ND	ND

Exemplo 11: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 podem bloquear a proliferação de células cancerosas mediadas por ligando CD40 em pacientes com linfoma não-Hodgkin

O acoplamento de CD40 pelo ligando CD40 induz a proliferação de células cancerosas a partir de pacientes com NHL. Um anticorpo antagonista anti-CD40 é esperado inibir esta proliferação. Os dois anticorpos candidatos anti-CD40 foram testados a diferentes concentrações (0,01 µg/ml a 100 µg/ml) para a sua capacidade para inibir a proliferação induzida pelo ligando CD40 de células NHL em pacientes. As células NHL de pacientes foram cultivadas em suspensão sobre-expressando o alimentador CD40L na presença de IL-4. A proliferação celular de NHL foi medida por ³H-timidina. Ambos os anticorpos mostraram-se muito eficazes para inibir a proliferação induzida pelo ligando CD40 de

células NHL (Tabela 12, n = 2). A inibição quase completa da proliferação induzida pelo ligando CD40 poderia ser alcançada em 1,0 a 10 µg/ml de concentração de anticorpos.

Tabela 12. Inibição da proliferação de células cancerosas induzida pelo ligando CD40 a partir de pacientes LN de NHL

Patient	Abs Conc (ug/ml)	CPM IgG1	CHIR-5.9		CHIR-12.12		Rituximab	
			CPM	% inhibition	CPM	% inhibition	CPM	% inhibition
BD	0.01	29525.5	25369	14	24793	16	29490.3	0
	0.1	29554	20265.33	31	13671	54	29832.7	-1
	1	29486.67	6785.33	77	453	98	26355.3	11
	10	29710	506.33	98	371	99	29427.3	1
	100	29372.33	512.33	98	386.67	99	ND	ND
PP	0.01	23572	23229.33	1	23666	0	25317.3	-7
	0.1	22520	19092.33	15	17197	24	26349.7	-17
	1	23535.67	1442.33	94	802.67	97	26515.7	-13
	10	23101.5	608.67	97	221.33	99	25478.3	-10
	100	23847.33	ND	ND	252	99	ND	ND
% inhibition: 100-(CPM with test Abs/CPM with control mAb) *100%								

Exemplo 12: Efeito de CHIR-5.9 no número de células viáveis NHL quando cultivadas com células portadoras de ligando CD40

Foram investigados os efeitos de CHIR-5.9 sobre o número de células viáveis NHL quando cultivadas com células portadoras de ligando CD40 ao longo de um período prolongado de tempo (dias 7, 10, e 14). O ligando CD40 de sinalização mediada por CD40 é importante para a sobrevivência das células B. Este conjunto de experiências avalia o efeito de anticorpos anti-CD40 no número de células NHL no dia 7, 10 e 14. Células NHL a partir de cinco pacientes foram cultivadas em suspensão sobre o CD40L expressando células de alimentação irradiadas, na presença de IL-4. A IgG de controlo humana e os anticorpos CHIR-5.9 foram adicionados em concentrações de 10 µg/ml no dia 0 e

no dia 7. As células viáveis em cada condição foram contadas no dia especificado. Os números de células no grupo de controlo (IgG) aumentaram com o tempo, como esperado. Um reduzido número de células foi recuperado a partir de culturas tratadas com CHIR-5.9 em comparação ao grupo de controlo. Os maiores níveis de redução em números de células por anticorpos CHIR-5.9 foram observados no dia 14 e foram, em média, de 80,5% (intervalo de 49-94%) em comparação com o isotipo de controlo (n = 5). Estes dados estão resumidos na Tabela 13.

Tabela 13. Efeito do anticorpo anti-CD40 (CHIR-5.9/5.11) nas células NHL de um paciente durante um período de cultura prolongado (dias 7, 10 e 14)

Patient	Days in culture	Viable cell numbers		% reduction compared to IgG control
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	
PS	0	100000 0	1000000	0.00
	7	935000	447500	52.14
	10	127090 0	504100	60.34
	14	102910 0	525000	48.98
MT	0	100000 0	1000000	0.00
	7	267600	182500	31.80

Patient	Days in culture	Viable cell numbers		% reduction compared to IgG control
		IgG	mAb CHIR-5.9/5.11	
	10	683400	191600	71.96
	14	1450000	225000	84.48
BRF	0	250000	250000	0.00
	7	145000	86667	40.23
	10	207500	65000	68.67
	14	570500	33330	94.16
DP	0	250000	250000	0.00
	7	188330	136670	27.43
	10	235000	128330	45.39
	14	428330	58330	86.38
PP	0	250000	250000	0.00
	7	270000	176670	34.57
	10	311670	128330	58.83
	14	458330	53330	88.36
* % reduction compare to ctrl Abs=100-(test Abs/ctrl Abs)*100				

Exemplo 13: CHIR-5.9 e CHIR-12-12 são capazes de matar células cancerosas dos nódulos linfáticos dos pacientes com NHL por ADCC

Tanto o CHIR-5.9 como o CHIR-12.12 são anticorpos inteiramente humanos do isotipo IgG₁, e foram mostradas induzir a morte de linhas celulares de linfoma *in vitro* pelo mecanismo de ADCC (Tabela 9). Foram testados quanto à sua capacidade para matar as células do cancro a partir de um único paciente NHL em ensaios *in vitro*. As células NK enriquecidas de doadores voluntários normais, quer frescas após isolamento ou após cultura durante a noite a 37°C foram usadas como células efectoras neste ensaio. Resultados semelhantes foram obtidos com ambas as células NK isoladas de fresco e as células NK utilizadas após cultura durante a noite. O nível mais elevado de ADCC foi observado com CHIR-12.12 comparado com CHIR-5.9 contra as células do próprio paciente NHL. As células NHL também expressam CD20, o antigénio alvo para o rituximab (Rituxan®), o que permitiu a comparação da atividade ADCC destes dois mAbs candidatos com rituximab. O anticorpo CHIR-12.12 e rituximab mostram nível semelhante de atividade ADCC com CHIR-5.9 de pontuação menor neste ensaio. Estes dados são mostrados nas Figuras 3A e 3B.

Exemplo 14: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 podem bloquear a sobrevivência mediada por CD40 e a proliferação das células cancerosas de pacientes com LLC

Os anticorpos candidatos podem bloquear a sobrevivência mediada por CD40 e a proliferação de células cancerosas de pacientes com LLC. Células de pacientes com LLC foram cultivadas em suspensão sobre CD40L expressando células CHO fixadas em formaldeído em duas condições diferentes: a adição do anticorpo IgG de isotipo humano (controle), e adição do anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12. Todos os anticorpos foram adicionados nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml na ausência de IL-4. As contagens de células foram realizadas a 24 e 48 h por ensaio de MTS. Um reduzido número foram recuperadas a partir de CHIR-5.9 (n = 6) e CHIR-12.12 (n = 2), em comparação com o grupo de controle. As maiores diferenças no número de células entre as culturas de anti-CD40 tratadas mAb e de controle tratados com anticorpos foram observados no ponto de tempo de 48 h. Estes dados estão resumidos na Tabela 14.

Tabela 14. Efeito dos anticorpos candidatos na sobrevivência e proliferação induzida por CD40 em células cancerosas de pacientes CLL medidos a 48 h após o início da cultura

Patient#	Ab conc (µg/ml)	Relative cell numbers			% reduction in cell numbers*	
		IgG1	CHIR-5.9/5.11	CHIR-12.12	CDR-5.9/5.11	CHIR-12.12
1	1	269.3 1	25.27	ND	90.62	ND
	10	101.5 8	33.07	ND	67.44	ND
	100	130.7 1	40.16	ND	69.28	ND

Patient#	Ab conc (µg/ml)	Relative cell numbers			% reduction in cell numbers*	
		IgG1	CHIR- 5.9/5.11	CHIR-12.12	CDR-5.9/5.11	CHIR-12.12
2	1	265.5 5	75.8	ND	71.46	ND
	10	227.5 7	128.5	ND	43.53	ND
	100	265.9 9	6.4	ND	97.59	ND
3	1	85.9	35.39	ND	58.80	ND
	10	70.44	39.51	ND	43.91	ND
	100	77.65	20.95	ND	73.02	ND
4	1	80.48	15.03	ND	81.32	ND
	10	63.01	19.51	ND	69.04	ND
	100	55.69	3.65	ND	93.45	ND
5	1	90.63	91.66	89.59	-1.14	1.15
	10	78.13	82.28	60.41	-5.31	22.68
	100	63.53	86.47	39.59	-36.11	37.68
6	1	130.2 1	77.6	71.88	40.40	44.80
	10	131.7 7	78.13	73.96	40.71	43.87
	100	127.0 8	76.56	82.29	39.75	35.25
* % reduction compared to control Abs=100-(test Abs/control Abs)*100						

Exemplo 15: CHIR-5.9 e CHIR-12.12 apresentam atividade anti-tumoral em modelos animais (eficácia da Farmacologia in vivo)

Os mAbs candidatos são esperados produzir os efeitos farmacológicos desejados para reduzir a carga do tumor, quer por/ambos de dois mecanismos anti-tumorais, bloqueio da proliferação/ sinal de sobrevivência e indução de ADCC. Os modelos de xenoinxerto de linfoma humano atualmente disponíveis usam linhas celulares de linfoma de longo prazo que, em contraste com células de cancro primário, não dependem da estimulação de CD40 para o seu crescimento e sobrevivência. Portanto, não se espera que o componente de atividade antitumoral destes mAbs baseada no bloqueio da proliferação do tumor/sinal de sobrevivência contribuam para a eficácia anti-tumoral nestes modelos. A eficácia nesses modelos é dependente da ADCC, o segundo mecanismo antitumoral associado com os mAbs CHIR-5.9 e CHIR-12.12. Dois modelos de xenoinxerto de linfoma humano com base em linhas celulares Namalwa e Daudi foram avaliados para a atividade anti-tumoral de mAb candidatos. Para demonstrar ainda mais a sua atividade terapêutica, estes mAbs

candidatos foram avaliados num modelo de faseado e não faseado de xenoenxerto de linfoma humano com base na linha celular Daudi.

Resumo de dados de eficácia in vivo

Quando administrado por via intraperitoneal (ip) uma vez por semana para um total de 3 doses, CHIR-12.12, um dos dois mAb candidatos, inibiu significativamente o crescimento de linfomas não faseados agressivos de células B (Namalwa) de um modo dependente da dose (Figura 4). O segundo mAb candidato, CHIR-5.9, foi testado apenas em dose única no presente estudo e foi menos eficaz do que CHIR-12.12 na mesma dose. Curiosamente, o CHIR-12.12 mostrou-se mais eficaz neste modelo do que o rituximab. É possível que a menor eficácia de rituximab possa ser devido à baixa expressão de CD20 na linha celular de linfoma de Namalwa. A eficácia observada com mAb candidatos tem maior importância, pois apenas um dos dois mecanismos de morte celular do cancro (ADCC) está operativo no processo atual de modelo de xenoenxerto de linfoma. Dois mecanismos de morte, ADCC e bloqueio de sinal de sobrevivência, deverão contribuir para as atividades anti-tumorais em pacientes com linfoma humanos. Isto é suscetível de aumentar a possibilidade de alcançar a eficácia em pacientes de linfoma humano. Os candidatos mAbs anti-CD40 também mostraram uma tendência para a inibição do crescimento do tumor num segundo modelo de linfoma de células B (modelo Daudi não validado, dados não mostrados). Em estudos de acompanhamento, os dois anticorpos candidatos foram mostrados ter eficácia anti-tumor dose-dependente em ambos os modelos, faseado e não faseado, de linfoma Daudi (Figuras 5 e 6, respetivamente). No modelo faseado de Daudi, o mAb CHIR-12.12 foi mais eficaz na redução do volume do tumor do que a uma dose semelhante de Rituxan®.

Modelos de xenoenxerto de linfoma de células B humanas

Para assegurar um crescimento tumoral consistente, células T deficientes de ratinhos nus foram irradiadas de todo o organismo a 3 Gy para suprimir ainda mais o sistema imunológico, um dia antes da inoculação do tumor. As células tumorais foram inoculadas subcutaneamente no flanco direito em 5×10^6 células por rato. O tratamento foi iniciado tanto um dia após o implante do tumor (modelos de xenoenxertos subcutâneos não faseados de linfoma de células B humanas, Namalwa e Daudi) ou quando o volume tumoral atingiu 200-400 mm³ (modelo Daudi faseado, geralmente 15 dias após a inoculação do tumor). Os ratinhos portadores de tumor foram injetados com mAbs anti-CD40 intraperitonealmente (ip) uma vez por semana, nas doses indicadas. Os volumes dos tumores foram registados duas vezes por semana. Quando o volume tumoral em qualquer grupo atingiu 2500 mm³, o estudo foi terminado. Note-se que no modelo Daudi faseado, os dados de volume tumoral foram analisados até ao dia 36, devido à morte de alguns ratinhos após esse dia. A regressão completa (RC) foi contada até ao final do estudo. Os dados foram analisados por ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis e correspondente pós-teste para comparação multi-grupo.

No modelo Namalwa não faseado, o mAb anti-CD40 CHIR-12.12, mas não o Rituxan® (rituximab), de forma significativa ($p = <0,01$) inibiu o crescimento de tumores Namalwa (redução do volume tumoral de 60% versus 25% para rituximab, $n = 10$ ratinhos/grupo) (Figura 4). Assim, neste modelo, o mAb anti-CD40 CHIR-12.12 foi mais potente do que o rituximab. É digno de nota que o segundo mAb candidato, CHIR-5.9, foi pelo menos tão eficaz quanto uma dose de rituximab em $1/10^{\text{th}}$ de que o rituximab. Ambos os mAb anti-CD40 CHIR-

12.12 e Rituxan impediram significativamente o desenvolvimento do tumor no modelo tumoral Daudi não faseado (14/15 resistência à inoculação do tumor) (Figura 5).

Quando estes anticorpos monoclonais anti-CD40 foram também comparados num modelo de xenoenxerto de Daudi faseado, no qual o tratamento iniciado quando o tumor subcutâneo era palpável, o mAb anti-CD40 CHIR-12.12 a 1 mg/kg provocou uma diminuição significativa do tumor ($p = 0,003$) com 60% de regressão completa (6/10), enquanto o rituximab na mesma dose não inibiu significativamente o crescimento do tumor nem causou a regressão completa (0/10). Veja a Figura 6.

Em resumo, o mAb anti-CD40 CHIR-12.12 inibiu significativamente o crescimento tumoral em modelos experimentais de linfoma. Com a mesma dose e regime, o mAb CHIR-12.12 apresentou melhor atividade anti-cancro do que o Rituxan® (rituximab). Além disso, nenhum sinal clínico de toxicidade foi observado com esta dose e regime. Estes dados sugerem que o mAb anti-CD40 CHIR-12.12 possui uma atividade anti-linfoma humano *in vitro* potente em modelos de xenoenxerto e poderia ser clinicamente eficaz para o tratamento do linfoma.

Exemplo 16: A farmacocinética de CHIR-5.9 e CHIR-12.12

A farmacocinética do mAb anti-CD40 em ratinhos foi estudada após administração de uma dose única IV e PI. O MaB Anti-CD40 exibiu elevada biodisponibilidade sistêmica após administração IP e prolongamento da semivida terminal (> 5 dias) (dados não mostrados). Este estudo piloto foi realizado para auxiliar na concepção de estudos

farmacológicos, no entanto, é de pouca ou nenhuma importância para a atividade de desenvolvimento deste mAb uma vez que este mAb totalmente humano não reage de forma cruzada com o rato CD40.

Exemplo 17: Caracterização do epítipo pelos anticorpos monoclonais CHIR-12,12 e CHIR-5.9

Para determinar a localização do epítipo de CD40 reconhecida pelos anticorpos monoclonais CHIR-12.12 e CHIR-5.9, foram realizadas análises SDS-PAGE e Western blot. CD40 purificado (0,5 µg) foi separado em 4-12% de gel NuPAGE sob condições redutoras e não redutoras, transferido para membranas de PVDF e sondado com anticorpos monoclonais a 10 µg/ml de concentração. As manchas foram sondadas com fosfatase alcalina conjugada com IgG anti-humana e desenvolvidas usando o substrato Western Blue^R estabilizado para a fosfatase alcalina (Promega).

Os resultados indicam que o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 reconhece os epítipos tanto nas formas não-reduzidas e reduzidas de CD40, com a forma não-reduzida de CD40 a exibir uma maior intensidade do que a forma reduzida de CD40 (Tabela 15, manchas não mostradas). O facto de o reconhecimento ser positivo para ambas as formas de CD40 indica que este anticorpo interage com uma parte conformacional do epítipo que é uma sequência linear. O anticorpo monoclonal CHIR-5.9 reconhece principalmente a forma não reduzida de CD40, sugerindo que este anticorpo interage com um epítipo primariamente conformacional (Tabela 15, manchas não mostradas).

Tabela 15. Identificação de domínios

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

Para mapear a região antigénica em CD40, os quatro domínios extracelulares de CD40 foram clonados e expressos em células de insetos, como proteínas de fusão GST. A secreção dos quatro domínios foi assegurada com um sinal de secreção de gp67. O sobrenadante de células de inseto foi analisado por SDS-PAGE e análise de Western blot para identificar o domínio contendo o epítipo.

O anticorpo monoclonal CHIR-12.12 reconhece um epítipo no domínio 2, sob ambas as condições, redutoras e não redutoras (Tabela 16; manchas não mostradas). Em contraste, o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 exibe reconhecimento muito fraco para o domínio 2 (Tabela 16; manchas não mostradas). Nenhum destes anticorpos reconheceu os domínios 1, 3 ou 4 nesta análise.

Tabela 16. Análise do domínio 2

	Reduzida	Não-reduzida
mAb CHIR-12.12	++	+++
mAb CHIR-5.9	+	+

Para definir mais precisamente o epítopo reconhecido pelo mAb CHIR-12.12, os péptidos foram sintetizados a partir do domínio extracelular 2 de CD40, que corresponde à sequência PCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT (resíduos 61-104 da sequência apresentada na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12). Membranas SPOTs (Sigma) contendo trinta e cinco péptidos 10mer com um deslocamento de 1 aminoácido foram gerados. A análise por Western blot com o mAb CHIR-12.12 e anti-IgG humana de beta-galactosidase, como anticorpo secundário foi realizada. A membrana foi despida e resondada com mAb CHIR-5.9 para determinar a região reconhecida por este anticorpo

Análise de sondagem SPOTs com o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12 a 10 µg/ml proporcionou reações positivas com os pontos 18 a 22. A região abrangida pela sequência destes péptidos é apresentada na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados de análises de sondas SPOT com o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-12.12

Spot Number	Sequence Region
18	HQHKYCDPNL (residues 78-87 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
19	QHKYCDPNLG (residues 79-88 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
20	HKYCDPNLGL (residues 80-89 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
21	KYCDPNLGLR (residues 81-90 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
22	YCDPNLGLRV (residues 82-91 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)

Estes resultados correspondem a um epítopo linear de: YCDPNL (resíduos 82-87 da sequência mostrada em SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12). Este epítopo contém Y82, D84 e N86, que foram previstos para ser envolvidos na interação do ligando CD40-CD40.

A análise de SPOTs com o mAb CHIR-5.9 mostrou um fraco reconhecimento dos péptidos representados pelas manchas 20-22 mostrados na Tabela 18, o que sugere o envolvimento da região YCDPNLGL (resíduos 82-89 da sequência mostrada em SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12) na sua ligação ao CD40. Deve notar-se que o mAb CHIR-12.12 e CHIR-5.9 competem entre si para a ligação a CD40 na análise BIACORE.

Tabela 18. Resultados de análises de sondas SPOT com o anticorpo monoclonal anti-CD40 CHIR-5.9

Spot Number	Sequence Region
20	HKYCDPNLGL (residues 80-89 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO: 12)
21	KYCDPNLGLR (residues 81-90 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)
22	YCDPNLGLRV (residues 82-91 of SEQ ID NO:10 or SEQ ID NO:12)

Os epítopos lineares identificados pelas análises SPOT estão dentro do módulo B1 CD40. A sequência do módulo B1 CD40 é:

HKYCDPNLGLRVQQGTSETDTIC (resíduos 80-103 da SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12).

Dentro do epítopo linear identificado para CHIR-12.12 é C83. Sabe-se que este resíduo de cisteína forma uma ponte dissulfureto com C103. É provável que o epítopo conformacional do mAb CHIR-12.12 contenha esta ligação

dissulfito (C83-C103) e/ou em torno dos aminoácidos conformacionalmente perto de C103.

Exemplo 18: Número de moléculas CD20 e CD40 em células Namalwa e Daudi

O número de moléculas de CD20 e CD40 sobre as células Namalwa e Daudi foi determinado tal como foi apresentado na Figura 7, utilizando-se as concentrações de anticorpos de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 µg/ml. Como pode ser visto na Figura 7, o número médio de moléculas de CD20 (alvo para o rituximab) é maior em ambas as linhas celulares Namalwa e Daudi que o número de moléculas de CD40 (alvo para o mAb CHIR-12.12).

Exemplo 19: ADCC do mAb CHIR-12.12 e rituximab contra as células do linfoma de Daudi

O rituximab e o mAb CHIR-12.12 candidato foram testados *in vitro* para a atividade de ADCC, em concentrações variáveis contra a linha celular de linfoma de Daudi como células alvo (T) e células purificadas NK, a partir de voluntários humanos saudáveis como células efectoras (E). As células NK humanas recém-isoladas foram misturadas com células de linfoma Daudi marcadas com calceína numa razão E: T de 10. A mistura de células foi incubada durante 4 horas a 37°C na presença das concentrações de ambos os indicados mAb CHIR-12.12 e rituximab. O nível de calceína libertado pelas células alvo lisadas no sobrenadante foi medido como Unidades Arbitrárias Fluorescentes (AFU). A percentagem de lise específica foi calculada como: $100 \times (\text{teste AFU} - \text{AFU libertação espontânea}) / (\text{AFU libertação máxima} - \text{AFU libertação espontânea})$, onde a libertação espontânea AFU é a calceína libertada pelas células alvo na ausência de anticorpos ou de células NK, e libertação máxima AFU é a

calceína libertada pelas células alvo sobre lise por detergente.

Foi observada uma concentração de anticorpo dependente da lise das células de Daudi (Figura 8; Tabela 19 abaixo). A lise máxima específica de células de linfoma alvo induzida por anti-CD40 foi maior em comparação com a lise induzida pelo rituximab (63,6% versus 45,9%, $n = 6$; teste t emparelhado de mAb CHIR-12.12 contra o rituximab, $p = 0,0002$). Além disso, o ED50 para o rituximab foi, em média ($n = 6$) 51,6 pM, 13 vezes mais elevado do que o ED50 para o mAb anti-CD40 CHIR-12.12 para esta atividade.

Tabela 19. ADCC comparativa de mAb CHIR-12.12 e rituximab contra o linfoma de células Daudi

NK Cell Donor	Maximal Killing (%)		ED50 (pM)	
	mAb CHIR-12.12	Rituximab	mAb CHIR-12.12	Rituximab
1	50.2	34.9	3.2	14.2
2	83.1	68.6	2.2	27.2
3	64.2	36.9	4.1	66.9
4	53.3	39.5	2.4	47.6
5	74.8	56.6	2.8	24.1
6	56.2	38.9	7.9	129.5
Average	63.6	45.9	3.8	51.6

Exemplo 20: CHIR-12.12 bloqueia a sobrevivência de CD40 mediada CD40L e vias de sinalização em células B humanas normais

O ligando solúvel CD40 (CD40L) ativa as células B e induz vários aspectos de respostas funcionais, incluindo o aumento da sobrevivência e proliferação e ativação de vias de sinalização NF κ B, ERK/MAPK, PI3K/Akt e p38. Além disso, a estimulação de CD40 mediada por CD40L proporciona sinais de sobrevivência mediante redução de PARP clivada e indução das proteínas anti-apoptóticas, XIAP e Mcl-1, em células B

normais. A estimulação de CD40 mediada por CD40L recruta igualmente TRAF2 e TRAF3 para se ligar ao domínio citoplasmático CD40.

Os estudos seguintes demonstram que CHIR-12.12 inibiu diretamente todos estes efeitos de estimulação com células B humanas normais. Por exemplo, o tratamento com CHIR-12.12 resultou num aumento da clivagem de caspase-9, caspase-3 e PARP, assim como redução de XIAP e de Mcl-1 numa forma dependente do tempo e dose, restabelecendo a apoptose das células B. O tratamento com CHIR-12.12 inibiu a fosforilação da quinase I κ B (IKK) α e β (via NF κ B), ERK, Akt e p38 em resposta à estimulação de CD40 mediada por CD40L. Além disso, verificou-se que CHIR-12.12 não provoca estes efeitos apoptóticos sem estimulação de CD40 mediada por CD40L inicial.

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

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

Resumidamente, verificou-se que a estimulação de CD40 mediada por CD40L fornece sinais de sobrevivência, uma vez que não resulta em aumentos de caspase-9, caspase-3 ou PARP

clivada ao longo do tempo, indicando que as células não foram submetidas a apoptose. No entanto, o tratamento com CHIR-12.12 resultou num aumento destes produtos de clivagem, indicando que o tratamento com CHIR-12.12 revoga os efeitos da ligação de CD40L na sobrevivência de sinalização em células B normais estimuladas por sCD40L, restabelecendo a apoptose das células B (dados não mostrados).

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

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

Resumidamente, a estimulação sCD40L resultou na expressão sustentada de Mcl-1 e de XIAP ao longo do tempo. No entanto, o tratamento das células estimuladas por sCD40L com CHIR 12.12 resultou num decréscimo na expressão destas proteínas ao longo do tempo (dados não mostrados). Uma vez que Mcl-1 e XIAP são sinais de "sobrevivência", capazes de bloquear a via de apoptose, estes resultados demonstram que o tratamento com CHIR-12.12 remove o bloqueio contra a apoptose em células B normais estimuladas por sCD40L.

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

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

Resumidamente, a estimulação por sCD40L resultou na fosforilação de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser 181) ao longo do tempo, no entanto, o tratamento com CHIR-12.12 revoga esta resposta à estimulação sCD40L em células B normais (dados não mostrados).

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

Nestas experiências, $0,6 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram estimuladas com 1 $\mu\text{g/ml}$ de sCD40L (Alexis Corp, Bingham, Nottinghamshire, UK). CHIR-12.12 (0,01, 0,1, 0,2, 0,5, 1,0 $\mu\text{g/ml}$) e IgG de controlo foram então adicionados. As células foram coletadas em 24 horas. Controlos de PARP clivada e β -actina foram detectados em lisados celulares por Western blot.

Resumidamente, o tratamento com CHIR-12.12 resultou no aumento da clivagem de PARP em células estimuladas por sCD40L de um modo dependente da dose e, portanto, anula a

via de sinalização de sobrevivência em células B normais estimuladas por sCD40L (dados não mostrados).

CHIR-12.12 inibiu a expressão de "sobrevivência" em proteínas anti-apoptóticas numa maneira dependente da dose.

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

Resumidamente, o tratamento com CHIR-12.12 reduziu a expressão de Mcl-1 e XIAP e aumentou a expressão de PARP clivada em células estimuladas por sCD40L de uma forma dependente da dose, e, portanto, anula estes bloqueios da via apoptótica em células B normais estimuladas por sCD40L (dados não mostrados).

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

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram tratadas com CHIR-12.12 (10 µg/ml) e apenas IgG de controlo (ou seja, as células não foram pré-estimuladas com sCD40L antes da adição do anticorpo). As células foram coletadas em 0, 4, 14 e 16 horas. Controlos XIAP, PARP clivada e β-actina foram detectados em lisados celulares por Western blot.

Em resumo, os resultados mostram que, sem estimulação sCD40L, as células expressavam concentrações aumentadas de PARP clivada, enquanto a expressão de XIAP permaneceu constante, tanto em células de controlo IgG tratadas e células CHIR-12.12 (dados não mostrados). Estes dados indicam que o CHIR-12.12 não desencadeia a apoptose em células B humanas normais sem estimulação por CD40L.

CHIR-12.12 inibe a fosforilação de IKK α (Ser180) e IKK β (Ser181), Akt, ERK e p38 em células B normais.

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram privadas de soro em meio contendo 1% de FBS e estimuladas com 1 μ g/ml de sCD40L (Alexis Corp, Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). As culturas foram tratadas com CHIR-12.12 (1 e 10 μ g/ml) e IgG de controlo. As células foram coletadas em 0 e 20 minutos. Fosfo-IKK α , fosfo-IKK β , fosfo-IKK β total, fosfo-ERK, ERK total, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-p38 e p38 total foram detectadas em lisados celulares por Western blot.

Resumidamente, a estimulação por sCD40L resultou em aumentos da fosforilação de IKK α/β , a fosforilação de ERK, a fosforilação Akt e a fosforilação de p38, levando assim à sobrevivência e ou proliferação das células. O tratamento das células com CHIR-12.12 revoga os efeitos da estimulação por sCD40L sobre estas vias de sinalização em células B normais (dados não mostrados).

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

Nestas experiências, $1,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%)

foram privadas de soro em meio contendo 1% de FBS e estimulada com 1 µg/ml de sCD40L (Alexis Corp, Bingham, Nottinghamshire, Reino Unido). As culturas foram também tratadas com CHIR-12.12 (1 e 10 µg/ml), Wortmanin (um inibidor de PI3K/Akt; 1 e 10 µM), LY 294002 (um inibidor de PI3K/Akt; 10 e 30 µM), e DP 98095 (um inibidor de MEK; 10 e 30 µg/ml). As células foram coletadas em 0 e 20 minutos. Fosfo-ERK, fosfo-Akt, Akt total, fosfo-IKKα/β e o total foram detectadas em lisados celulares por Western blot.

Resumidamente, os resultados demonstram que CHIR-12.12 anula a fosforilação de todas estas moléculas de transdução de sinal, enquanto que os inibidores de transdução de sinal mostraram apenas revogação específica de sinalização, o que indica que CHIR-12.12 inibe provavelmente a montante destas moléculas de transdução de sinal mediada pela estimulação de CD40L (dados não mostrados).

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

Nestas experiências, $4,0 \times 10^6$ células B humanas normais de doadores saudáveis (percentagem de pureza entre 85-95%) foram privadas de soro durante quatro horas em meio contendo 1% de FBS e estimuladas com 1 µg/ ml de sCD40L (Alexis Corp Bingham, Nottinghamshire, UK) durante 20 minutos. As células foram coletadas em 0 e 20 minutos. CD40 foi imunoprecipitado usando anti-CD40 policlonal (Santa Cruz Biotechnology, CA), e foi sondado num Western Blot com mAb anti-TRAF2 (Santa Cruz Biotechnology, CA), mAb anti-TRAF3 (Santa Cruz Biotechnology, CA), e anti-CD40 (Santa Cruz Biotechnology, CA).

Resumidamente, os resultados mostram que TRAF2 e TRAF3 co-precipitaram com CD40 após estimulação por sCD40L. Em contraste, o tratamento com CHIR-12.12 revogou a formação dos complexos de sinalização CD40-TRAF2/3 em células B normais estimuladas por sCD40L. Não houve alteração na expressão de CD40 (dados não mostrados).

Sem ser limitado pela teoria, os resultados destas experiências, e os resultados nos exemplos acima referidos, indicam que o anticorpo CHIR-12.12, é um antagonista de acção dupla do anticorpo monoclonal anti-CD40 tendo uma combinação única de propriedades. Estes blocos de anticorpos monoclonais CD40L totalmente humanos medeiam as vias de sinalização CD40 para a sobrevivência e proliferação das células B; este antagonismo conduz à morte celular final. CHIR-12.12 também medeia o reconhecimento e a ligação por células efectoras, iniciando citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Uma vez que CHIR-12.12 está ligado a células efectoras, as enzimas citolíticas são libertadas, levando à apoptose de células B e lise. CHIR-12.12 é um anticorpo anti-tumoral mais potente do que o rituximab, quando comparados em modelos pré-clínicos de tumores.

Exemplo 21: Atividade agonista e antagonista contra células primárias do cancro a partir de pacientes NHL, CLL e MM

Em colaboração com investigadores clínicos, o mAbs candidato é testado para uma variedade de atividades (listadas abaixo) contra as células cancerosas primários de pacientes com NHL e CLL e com mieloma múltiplo.

- Efeito agonista em ensaios de proliferação (8 pacientes com NHL, 8 pacientes com LLC e 8 pacientes MM)

- Efeito antagonista em ensaios de proliferação (8 pacientes com NHL, 8 pacientes com LLC e 8 pacientes MM)
- Efeito de apoptose por ensaio de anexina V (pacientes 3-4 NHL, 4 pacientes com LLC, e 4 pacientes MM)
- Inversão de sinal de sobrevivência por ensaio de anexina V (3 pacientes com NHL, 3 pacientes com LLC e 3 pacientes MM)
- Citotoxicidade dependente de complemento (4 pacientes com NHL, 4 pacientes com LLC, e 4 pacientes MM)
- Citotoxicidade dependente de anticorpos (6 pacientes com NHL, 6 pacientes com LLC e 6 pacientes MM)

Exemplo 22: Identificação de espécies animais relevantes para estudos de toxicidade

Como estes dois anticorpos candidatos não reagem de forma cruzada com roedor CD40, outras espécies devem ser identificadas para testar os efeitos toxicológicos.

A capacidade dos anticorpos candidatos anti-CD40 para reagir de forma cruzada com o CD40 de animais é testada por ensaios de citometria de fluxo. Rato, coelho, cão, macacos cinomólgos e macacos sagui são testados neste estudo.

Os anticorpos candidatos mostram actividade antagonista após ligação a CD40 nas células B humanas. Para identificar uma espécie animal que tenha resposta semelhante aos anticorpos candidatos, os linfócitos a partir de espécies que mostram a ligação de anticorpos candidatos são testados em ensaios de proliferação para a actividade antagonista. Os linfócitos das espécies seleccionadas para a ligação de

anticorpos antagonistas candidatos são ainda testados quanto à sua capacidade para servir como células efectoras para matar linhas celulares de linfoma que expressam CD40 por meio do mecanismo de ADCC. Finalmente, as espécies animais selecionadas são testadas num estudo de IHQ para o padrão de tecido de ligação de anticorpos candidatos. As espécies de animais que respondem aos anticorpos candidatos, nestes ensaios de um modo semelhante ao observado para as células humanas são escolhidas para estudos de toxicologia.

Os estudos iniciais indicam que o candidato mAbs anti-CD40, reage de forma cruzada com o CD40 de macaco cinomólgo.

Exemplo 23: Perfil do tumor alvo de CHIR-5.9 e CHIR-12.12

Para determinar o perfil relativo do tumor alvo de CHIR-12.12 e CHIR-5.9 mAbs, mAb candidatos fluorescentes marcados com anticorpos de controlo de isotipo são administradas em ratinhos portadores de tumor. Espécimes de tumores e órgãos normais são colhidos em diferentes pontos de tempo depois da dosagem. A acumulação de anticorpo marcado em tumores e órgãos normais é analisada.

Exemplo 24: Mecanismo de ação de CHIR-5.9 e CHIR-12.12

Para elucidar o mecanismo que medeia a inibição do crescimento tumoral por mAbs CHIR-5.9 e CHIR-12.12, os seguintes estudos são realizados:

Receptor de knock-out Fc ou modelo de bloqueio: ADCC é mediada pela ligação de células efectoras, tais como NK, macrófagos, monócitos para a porção Fc do anticorpo através do receptor Fc. Ratos deficientes em activar os receptores Fc, bem como anticorpos modificados para perturbar a

ligação Fc a esses receptores irão bloquear a inibição do crescimento de tumor mediada por ADCC. A perda ou a inibição de tumor significativamente reduzida neste modelo irá sugerir que a inibição do crescimento do tumor por estes dois mAbs candidatos é mediada, principalmente, por um mecanismo de ADCC.

Exemplo 25: Formulação farmacêutica líquida de Anticorpos Antagonistas Anti-CD40

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do pH da solução na estabilidade do anticorpo antagonista anti-CD40 CHIR-12-12 por ambos os métodos biofísicos e bioquímicos, a fim de selecionar o melhor ambiente de solução para este anticorpo. Resultados da calorimetria de varrimento diferencial (DSC) mostraram que a estabilidade da conformação de CHIR-12.12 é ótima em formulações com pH 5,5-6,5. Com base numa combinação de SDS-PAGE, HPLC de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) e HPLC de permuta de cátions (CEX-HPLC), a estabilidade físico-química do CHIR-12.12 é ótima a cerca de pH 5,0-5,5. Tendo em conta estes resultados, uma formulação farmacêutica líquida recomendada compreendendo este anticorpo é uma formulação compreendendo CHIR-12.12 formulado a cerca de 20 mg/ml em cerca de 10 mM de succinato de sódio, cerca de 150 mM de cloreto de sódio, e possuindo um pH de cerca de pH 5,5.

Materiais e Métodos

O anticorpo CHIR-12.12 usado nos estudos de formulação é um anticorpo monoclonal humano produzido por um processo de cultura de células CHO. Este mAb tem um peso molecular de 150 kDa e consiste em duas cadeias leves e duas cadeias pesadas ligadas entre si por bandas de dissulfureto. É destinado contra o receptor CD40 da superfície celular em

células que expressam CD40, incluindo as células B normais e malignas, para o tratamento de vários cancros e doenças autoimunes/inflamatórias.

O fármaco anti-CD40 usado para este estudo é um derivado de CHO purificado anti-CD40 (CHIR-12.12). A composição do fármaco foi de 9,7 mg/ml de anticorpo CHIR-12.12 em 10 mM de citrato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, a pH 6,5. A amostra de controlo neste estudo foi a substância medicamentosa recebida, seguida por congelação à $\leq -60^{\circ}\text{C}$, descongelado à temperatura ambiente e, juntamente com amostras de teste da estabilidade a pontos de tempo pré-determinados. As amostras de estabilidade foram preparadas por diálise da substância medicamentosa contra diferentes valores de pH e a concentração de CHIR-12.12 em cada amostra foi determinada por UV 280, tal como apresentado na Tabela 20.

Tabela 20. Formulações de CHIR-12.12

Buffer Composition	pH	CHIR-12.12 Concentration (mg/ml)
10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride	4.5	9.0
10 mM sodium succinate, 150 mM sodium chloride	5.0	9.3
10 mM sodium succinate, 150 mM sodium chloride	5.5	9.2
10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride	6.0	9.7
10 mM sodium citrate, 150 mM sodium chloride	6.5	9.4
10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride	7.0	9.4
10 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride	7.5	9.5
10 mM glycine, 150 mM sodium chloride	9.0	9.5

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

Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

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

SDS-PAGE

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

Cromatógrafo de Exclusão de Tamanho (SEGHPLC)

Fragmentação e agregação das proteínas também foram medidas por Water Alliance HPLC com uma coluna Tosohaas TSK-GEL 3000SWXL, 100 mM de fosfato de sódio, pH 7,0 como fase móvel a um caudal de 0,7 ml/min.

Cromatografia de Permuta Catiónica (CEX-HPLC)

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

Resultados e Discussão

Estudo de estabilidade conformacional.

O desdobramento térmico de CHIR-12.12 revelou pelo menos duas transições térmicas, provavelmente representando o desdobramento de fusão dos de domínios Fab e de Fe, respectivamente. A temperaturas mais elevadas, a proteína presumivelmente agregou-se, resultando na perda de sinal de DSC. Para efeitos de rastreio da formulação, a menor temperatura de transição térmica foi definida como a

temperatura de fusão, T_m , neste estudo. A Figura 13 mostra a temperatura de fusão térmica, tal como uma função do pH da formulação. Formulações a pH 5,5-6,5 forneceram anti-CD40, com estabilidade conformacional superior, como demonstrado pelas temperaturas de fusão térmica superiores.

Análise de SDS-PAGE.

As amostras de formulação de CHIR-12.12 a pH 4,5-9,0 foram incubadas a 40°C durante 2 meses, e submetidas a análise de SDS-PAGE (dados não mostrados). Sob condições não redutoras, as espécies com peso molecular (PM) de 23 kDa e 27 kDa foram observadas em formulações acima de pH 5,5, e não foram observadas espécies com PM de 51 kDa em todas as formulações, mas apareceram menos a pH 5,0-5,5. Uma espécie com PM de 100 kDa pode ser vista, a pH 7,5 e pH 9,0.

Sob condições redutoras, o CHIR-12.12 foi reduzido a cadeias pesadas e cadeias leves livres com PM de 50 kDa e 24 kDa, respectivamente. A espécie de 100 kDa pareceu não totalmente redutível e aumentou com o aumento do pH da solução, sugerindo que a associação covalente não-dissulfureto pode ocorrer nas moléculas. Uma vez que havia outras espécies com identidades desconhecidas na SDS-PAGE, a comparação da estabilidade de cada formulação é baseada na pureza remanescente de CHIR-12.12. Formulações a pH 5,0-6,0 proporcionaram um ambiente mais estável para CHIR-12.12. Foram detectados poucos agregados por SDS-PAGE (dados não mostrados).

Análise SEC-HPLC.

Análise SEC-HPLC detectou o CHIR-12.12 intacto como a principal espécie de pico, uma espécie de agregação como

uma espécie de pico de frente separada das principais espécies de pico, uma espécie de fragmento grande como um pico de ombro na parte de trás das principais espécies de pico, e pequenas espécies de fragmentos foram detectadas após as espécies de pico principal. Após incubação a 5°C e 25°C durante 3 meses, quantidades negligenciáveis de fragmentos proteicos e agregados (<1,0%) foram detectadas nas formulações acima e os principais espécies de pico CHIR-12,12 mantém-se maior do que 99% de pureza (dados não mostrados). No entanto, fragmentos de proteína desenvolveram-se gradualmente após o armazenamento a 40°C, e mais fragmentos se formaram a pH 4,5 e pH 6,5-9,0, tal como mostra a Tabela 21. Depois de incubar as formulações CHIR-12.12 a 40°C durante 3 meses, cerca de 2-3% de agregados foram detectados em pH 7,5 e pH 9,0, enquanto menos de 1% de agregados foram detectados em outras formulações de pH (dados não mostrados). Os resultados de SEC-HPLC indicam que o CHIR-12.12 é mais estável a cerca de pH 5,0-6,0.

Tabela 21. Resultados SEC-HPLC da estabilidade em amostras de CHIR-12-12 em condições de armazenamento em tempo real e acelerado

Sample	Main peak %				Fragments %			
	t=0	40°C 1 m	40°C 2m	40°C 3m	t=0	40°C 1 m	40°C 2m	40°C 3m
Control	99.4	99.2	99.9	99.5	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
pH 4.5	99.4	93.2	86.0	81.3	<1.0	6.4	13.2	18.1
pH 5.0	99.8	98.7	91.3	89.2	<1.0	<1.0	7.8	10.2
pH 5.5	99.8	98.9	91.4	90.6	<1.0	<1.0	7.6	8.8
pH 6.0	99.6	97.7	90.4	87.3	<1.0	1.9	8.2	11.7
pH 6.5	99.3	93.4	89.0	86.9	<1.0	5.6	9.9	12.4
pH 7.0	99.2	93.9	87.4	85.1	<1.0	5.5	11.1	13.5
pH 7.5	99.1	92.8	84.4	81.9	<1.0	6.4	12.9	16.2
pH 9.0	99.3	82.4	61.6	50.6	<1.0	15.4	36.2	47.6

Análise de CEX-HPLC.

Análise de CEX-HPLC detectou o CHIR-12.12 intacto como a principal espécie de pico, as variantes ácidas eluídas mais cedo do que as principais espécies de pico, e C-terminais de lisina variantes de adição eluídas após as espécies principais de pico. A Tabela 22 mostra a dependência da percentagem de pico principal restante de CHIR-12.12 e as variantes de espécies ácidas no pH da solução. A amostra de controlo continha já um elevado grau de espécies ácidas (~33%), provavelmente devido a uma fermentação em fase inicial e processos de purificação. A susceptibilidade de CHIR-12.12 às soluções de pH superior é evidenciada por dois factos. Em primeiro lugar, a amostra de formulação inicial a pH 9,0 ($t = 0$) gerou já mais de 12% de espécies ácidas do que o controlo. Em segundo lugar, a percentagem de espécies ácidas aumentaram acentuadamente com o aumento do pH. A mudança de carga relacionada com a degradação é provavelmente devido à desaminação. Os dados acima indicam que este tipo de degradação de CHIR-12.12 foi minimizado a pH cerca de 5,0-5,5.

Tabela 22. Percentagem de área do pico por CEX-HPLC para CHIR-12.12 na formulação de pH diferente sob condições de armazenamento em tempo real e acelerado

Sample	Main peak %					Acidic variants %				
	t=0	5°C 3m	25°C 3m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3m	25°C 3m	40°C 1 m	40°C 2 m
Control	49.2	49.8	49.8	49.2	50.3	32.0	33.7	33.7	32.0	33.6
pH 4.5	48.5	49.7	43.7	39.7	30.0	32.5	32.6	38.0	44.2	56.4

Sample	Main peak %					Acidic variants %				
	t=0	5°C 3m	25°C 3m	40°C 1 m	40°C 2 m	t=0	5°C 3m	25°C 3m	40°C 1 m	40°C 2 m
pH 5.0	49.6	49.8	48.3	40.6	31.4	32.7	31.8	35.0	44.3	57.1
pH 5.5	50.7	50.3	48.1	40.0	30.2	32.6	31.8	37.8	48.9	63.3
pH 6.0	50.2	49.9	47.9	37.4	23.9	33.1	33.6	38.5	54.9	72.7
pH 6.5	49.4	49.9	42.3	29.7	14.6	33.3	33.6	47.7	65.2	84.6
pH 7.0	49.7	49.9	21.9	-	-	34.4	36.4	64.4	-	-
pH 7.5	49.3	48.3	12.7	-	-	35.5	40.1	79.2	-	-
pH 9.0	41.3	31.8	-	-	-	44.7	59.9	-	-	-

Conclusão

O pH tem um efeito significativo sobre a estabilidade conformacional e físico-química de CHIR-12.12. A mudança de carga relacionada com a degradação foi determinada ser a principal via de degradação para CHIR-12.12, que foi minimizado pelo pH 5,0-5,5. Com base nos dados globais de estabilidade, uma formulação farmacêutica líquida recomendada compreendendo este anticorpo é uma formulação compreendendo CHIR-12.12 a cerca de 20 mg/ml formulado em cerca de 10 mM de succinato de sódio, a cerca de 150 mM de cloreto de sódio e possuindo um pH de cerca de pH 5,5.

Exemplo 26: Estudos clínicos com CHIR-5.9 e CHIR-12.12

Objetivos clínicos

O objetivo geral é fornecer uma terapia efetiva para tumores de células B, orientando-os com um anti-CD40 IgG1. Estes tumores incluem linfoma de células B, linfoma linfocítico crônico (LLC), leucemia linfoblástica aguda (ALL), mieloma múltiplo (MM), macroglobulinemia de Waldenstrom e doença sistêmica de Castleman. O sinal para estas doenças é determinado na fase II, embora algum grau de atividade possa ser obtido na fase I. Inicialmente o agente é estudado como agente único, mas vai ser combinado com outros agentes quimioterapêuticos, e outros anticorpos, como prosseguimento do desenvolvimento.

Fase I

- Avaliar a segurança e farmacocinética - escalonamento de dose em pacientes com neoplasias de células B.
- Escolha da dose com base na segurança, tolerabilidade e mudança nos marcadores séricos de CD40. Em geral é procurada uma MTD, mas outras indicações de eficácia (depleção de células B CD40+, etc.) podem ser adequadas para determinação da dose.
- Apreciação de mais de uma dose, especialmente para as diferentes indicações, por exemplo, a dose de CLL pode ser diferente do que de NHL. Assim, alguma procura de dose pode ser necessária na fase II.
- Os pacientes são dosados semanalmente com amostragem em tempo real de farmacocinética (PK). Inicialmente, um ciclo de 4 semanas é a dosagem máxima permitida. A Pk pode ser altamente variável, dependendo da doença estudada, da densidade de CD40, etc.
- Este ensaio está aberto a pacientes com linfoma de células B, LLC, e, potencialmente, outras neoplasias de células B.
- Decisão de suspender ou continuar os estudos é baseada em segurança, dose, e evidências preliminares de atividade anti-tumor.
- Actividade do fármaco como determinado pela taxa de resposta é determinada na Fase II.
- Identificar a dose para a Fase II.

Fase II

Vários ensaios serão iniciados nos tipos de tumores acima mencionados, com a concentração no linfoma de células B, LLC e Mieloma Múltiplo (MM). Julgamentos separados podem ser necessários em NHL de baixo grau e de intermédio/alto grau como o CD40 pode ter uma função diferente, dependendo do grau do linfoma. Na doença de baixo grau, o CD40 atua mais como um fator de sobrevivência, evitando a apoptose. Na doença de grau mais elevado, a interrupção da sinalização do CD40 pode conduzir à morte celular. Mais do que uma dose, e mais do que um programa podem ser testados num ambiente randomizado de fase II.

Em cada doença, o alvo é a população que falhou o padrão atual de tratamento:

- LLC: pacientes que eram resistentes ao Campath® e quimioterapia.
 - NHL de baixo grau: falhas de Rituxan® ou CHOP-R
 - NHL intermédio: falhas de CHOP-R
 - Mieloma Múltiplo: falhas de quimioterapia
-
- ✓ a decisão de suspender ou continuar com o estudo é baseado em prova de conceito terapêutico na Fase II
 - ✓ Determinar se o marcador substituto pode ser usado como indicador precoce da eficácia clínica
 - ✓ Identificar doses para a Fase III

Fase III

A Fase III dependerá de onde o sinal for detectado na fase II, e que terapias concorrentes são consideradas como norma. Se o sinal está numa fase da doença em que não há um padrão de terapia, então um estudo bem controlado pode servir como um ensaio piloto. Se houver agentes concorrentes que são considerados padrão, então estudos de cabeça-a-cabeça são conduzidos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Chen, Bao-Lu Hurst, Deborah

Lee, Sang Hoon Longo, Li Lu, Xiaofeng Luqman, Mohammad
Yabannavar, Asha Zaror, Isabel

<120> Utilização de anticorpos monoclonais antagonistas
anti-cd40

<130> PP20107.004 (282916)

<150> 60/565,710

<151> 2004-04-27

<150> 60/525,579

<151> 2003-11-26

<150> 60/517,337

<151> 2003-11-04

<160> 12

<170> FastSEQ para Windows versão 4.0

<210> 1

<211> 720

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Sequência de codificação para a cadeia leve do
anticorpo anti-CD40 humano 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> Artificial Sequence

<220>

<223> Light chain of 12.12 human anti-CD40 antibody

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Coding sequence for heavy chain of 12.12 human anti-CD40 antibody (with introns)

<400> 3

```

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

```

```

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 2016

```

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain of 12.12 human anti-CD40 antibody

<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> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain of variant of 12.12 human anti-CD40 antibody

<400> 5

```
Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1      5      10      15
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20      25      30
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35      40      45
Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50      55      60
Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
 65      70      75      80
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85      90      95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
100      105      110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr
115      120      125
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130      135      140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
145      150      155      160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165      170      175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180      185      190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195      200      205
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
210      215      220
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys
225      230      235      240
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245      250      255
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260      265      270
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275      280      285
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290      295      300
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305      310      315      320
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325      330      335
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340      345      350
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355      360      365
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
370      375      380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385      390      395      400
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405      410      415
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420      425      430
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435      440      445
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450      455      460
Leu Ser Pro Gly Lys
465
```

<210> 6
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Light chain of 5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 6

```

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

```

<210> 7
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy chain of 5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 7

```

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1          5          10          15

```

```

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
      20      25      30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
      35      40      45
Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
      50      55      60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
      65      70      75      80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
      85      90      95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
      100      105      110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
      115      120      125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      130      135      140
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys
      145      150      155      160
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
      165      170      175
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
      180      185      190
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
      195      200      205
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
      210      215      220
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
      225      230      235      240
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
      245      250      255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
      260      265      270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
      275      280      285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
      290      295      300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
      305      310      315      320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
      325      330      335
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
      340      345      350
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
      355      360      365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
      370      375      380
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
      385      390      395      400
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
      405      410      415
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      420      425      430
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      435      440      445
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      450      455      460
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      465      470

```

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy chain of variant of 5.9 human anti-CD40 antibody

<400> 8

```

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1          5          10          15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
          20          25          30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
          35          40          45
Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50          55          60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 65          70          75          80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
          85          90          95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
          100          105          110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
          115          120          125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          130          135          140
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
145          150          155          160
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          165          170          175
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          180          185          190
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          195          200          205
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
          210          215          220
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225          230          235          240
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          245          250          255
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          260          265          270
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          275          280          285
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
          290          295          300
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305          310          315          320
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          325          330          335
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          340          345          350
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          355          360          365
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
          370          375          380
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385          390          395          400
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          405          410          415
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          420          425          430
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
          435          440          445
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
          450          455          460
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465          470

```

<210> 9

<211> 612

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

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

<221> misc_feature

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

<223> Coding sequence for short isoform of human CD40

<400> 9

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

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

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

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa 192
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
50 55 60

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

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc 288
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
85 90 95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg 336
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
100 105 110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tgc ccc ggc 384
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
115 120 125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag 432
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
130 135 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa 480
Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
145 150 155 160

tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tgc gct gag agc cct ggt ggt 528
Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
165 170 175

gat ccc cat cat ctt cgg gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt 576
Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
180 185 190

ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa 612
Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Ala Asn Gln *
195 200
```

<210> 10

<211> 203
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

```

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

```

<210> 11
 <211> 834
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> Coding sequence for long isoform of human CD40

<400> 11

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

Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His	
65					70					75					80	
aaa	tac	tgc	gac	ccc	aac	cta	ggg	ctt	cgg	gtc	cag	cag	aag	ggc	acc	288
Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	
				85					90					95		
tca	gaa	aca	gac	acc	atc	tgc	acc	tgt	gaa	gaa	ggc	tgg	cac	tgt	acg	336
Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr	
			100					105					110			
agt	gag	gcc	tgt	gag	agc	tgt	gtc	ctg	cac	cgc	tca	tgc	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	ggg	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	tgg	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	cgg	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> 12
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met	Val	Arg	Leu	Pro	Leu	Gln	Cys	Val	Leu	Trp	Gly	Cys	Leu	Leu	Thr
1				5					10					15	
Ala	Val	His	Pro	Glu	Pro	Pro	Thr	Ala	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Tyr	Leu
			20					25					30		
Ile	Asn	Ser	Gln	Cys	Cys	Ser	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Gln	Lys	Leu	Val
		35					40					45			
Ser	Asp	Cys	Thr	Glu	Phe	Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu
	50					55					60				
Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg	Glu	Thr	His	Cys	His	Gln	His
65				70					75					80	
Lys	Tyr	Cys	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr
			85					90						95	
Ser	Glu	Thr	Asp	Thr	Ile	Cys	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	His	Cys	Thr
			100					105					110		
Ser	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Cys	Val	Leu	His	Arg	Ser	Cys	Ser	Pro	Gly
		115					120					125			
Phe	Gly	Val	Lys	Gln	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Thr	Ile	Cys	Glu
130						135					140				
Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys
145					150				155					160	
Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln
				165					170					175	
Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu
			180					185					190		
Arg	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile
		195					200					205			
Leu	Leu	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Lys	Pro	Thr	Asn
	210					215					220				
Lys	Ala	Pro	His	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Gln	Glu	Ile	Asn	Phe	Pro	Asp
225				230					235					240	
Asp	Leu	Pro	Gly	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Val	Gln	Glu	Thr	Leu	His
				245					250					255	
Gly	Cys	Gln	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Asp	Gly	Lys	Glu	Ser	Arg	Ile	Ser
			260					265					270		
Val	Gln	Glu	Arg	Gln											
			275												

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal anti-CD40 humano, para utilização no tratamento de um cancro caracterizado pela expressão de CD40, em que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 humano é selecionado a partir do grupo que consiste em:

a) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo capaz de ligar o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como Patente de Depósito n° PTA-5542 ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como a Patente de Depósito n° PTA-5543;

b) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-87 da sequência de CD40 humano apresentado na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12;

c) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-89 da sequência de CD40 humano apresentada na SEQ ID N°: 10 ou SEQ ID N°: 12; e

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

em que o referido anticorpo é administrado em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos.

2. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo é o anticorpo monoclonal

CHIR-5.9 obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como a Patente de Depósito nº PTA-5542 ou o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 obtido a partir da linha celular de hibridoma depositada na ATCC como a Patente de Depósito nº PTA-5543.

3. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo compreende:

(i) a região determinante de complementaridade (CDR) dos resíduos das SEQ ID N°: 2 e a região determinante de complementaridade (CDR) dos resíduos da SEQ ID N°: 4; ou
(ii) a região determinante de complementaridade (CDR) dos resíduos da SEQ ID N°: 6, e a região determinante de complementaridade (CDR) dos resíduos da SEQ ID N°: 7.

4. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de entre o grupo consistindo em:

(i) resíduos 21-132 da SEQ ID N°: 2;
(ii) resíduos 21-239 da SEQ ID N°: 2;
(iii) SEQ ID N°: 2;
(iv) resíduos 20-139 da SEQ ID N°: 4;
(v) resíduos 20-469 da SEQ ID N°: 4;
(vi) SEQ ID N°: 4;
(vii) resíduos 20-469 da SEQ ID N°: 5;
(viii) SEQ ID NO: 5;
(ix) resíduos 21-132 da SEQ ID N°: 2 e resíduos 20-139 de SEQ ID N°: 4;

(x) resíduos 21-239 da SEQ ID N°: 2 e resíduos 20-469 da SEQ ID N°: 4;

(xi) resíduos 21-239 da SEQ ID N°: 2 e resíduos 20-469 de SEQ ID N°: 5;

(xii) SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 4; e

(xiii) SEQ ID N°: 2 e SEQ ID N°: 5.

5. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácidos selecionada de entre o grupo consistindo em:

(i) resíduos 21-132 da SEQ ID N°: 6;

(ii) resíduos 21-239 da SEQ ID N°: 6;

(iii) SEQ ID N°: 6;

(iv) resíduos 20-144 da SEQ ID N°: 7;

(v) resíduos 20-474 da SEQ ID N°: 7;

(vi) SEQ ID N°: 7;

(vii) resíduos 20-474 da SEQ ID N°: 8;

(viii) SEQ ID N°: 8;

(ix) resíduos 21-132 da SEQ ID N°: 6 e os resíduos 20-144 da SEQ ID N°: 7;

(x) resíduos 21-239 da SEQ ID N°: 6 e os resíduos 20-474 da SEQ ID N°: 7;

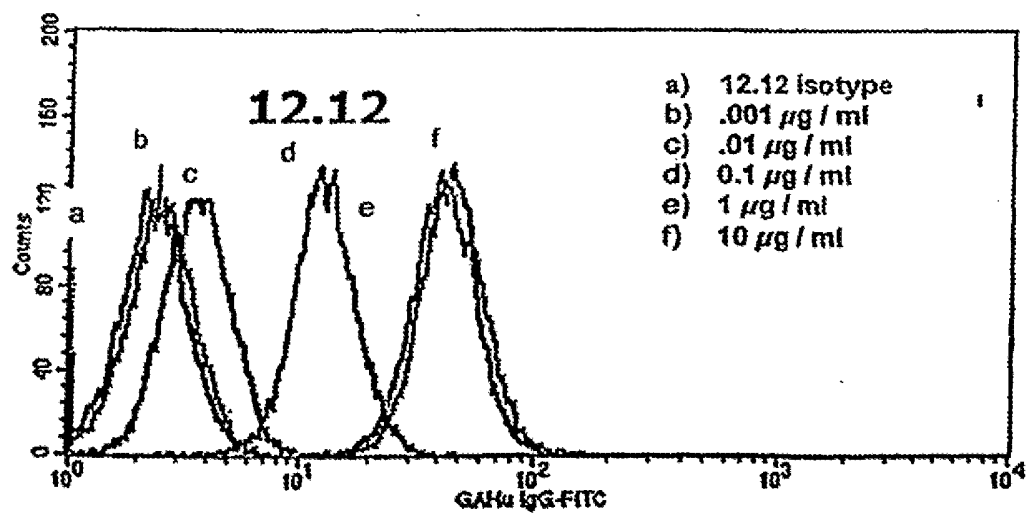
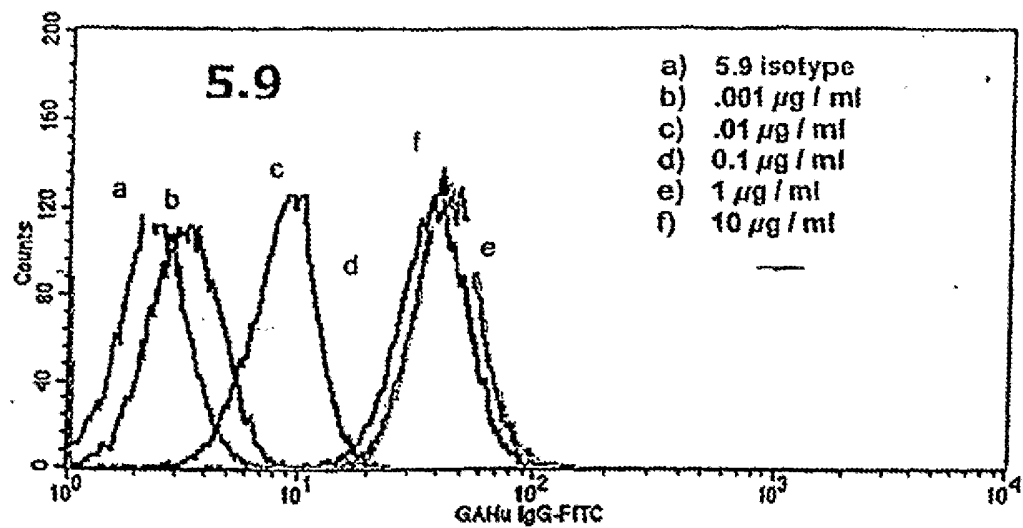
(xi) resíduos 21-239 da SEQ ID N°: 6 e os resíduos 20-474 da SEQ ID N°: 8;

(xii) SEQ ID N°: 6 e SEQ ID N°: 7; e

(xiii) SEQ ID N°: 6 e SEQ ID N°: 8.

6. Anticorpo para utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o referido anticorpo se liga a CD40 humano com uma afinidade (K_D) de pelo menos cerca de 10^{-6} M ou, pelo menos, 10^{-8} M.
7. Anticorpo para utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o referido anticorpo é um fragmento de ligação ao antigénio de um anticorpo monoclonal, em que o referido fragmento conserva a capacidade de se ligar especificamente ao antigénio CD40 humano.
8. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 7, em que o referido fragmento é selecionado a partir do grupo consistindo num fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fv e um fragmento Fv de cadeia simples.
9. Anticorpo para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 e 3-8, em que o referido anticorpo é produzido por uma linha celular CHO.
10. Anticorpo para utilização de acordo com qualquer reivindicação anterior, em que o referido anticorpo é administrado em combinação com pelo menos uma outra terapia do cancro.
11. Anticorpo para utilização de acordo com a reivindicação 10, em que a outra terapia do cancro é administrada antes, durante, ou após a terapia do anticorpo antagonista anti-CD40.

Figura 1A



Intensidade de fluorescência

Figura 1B

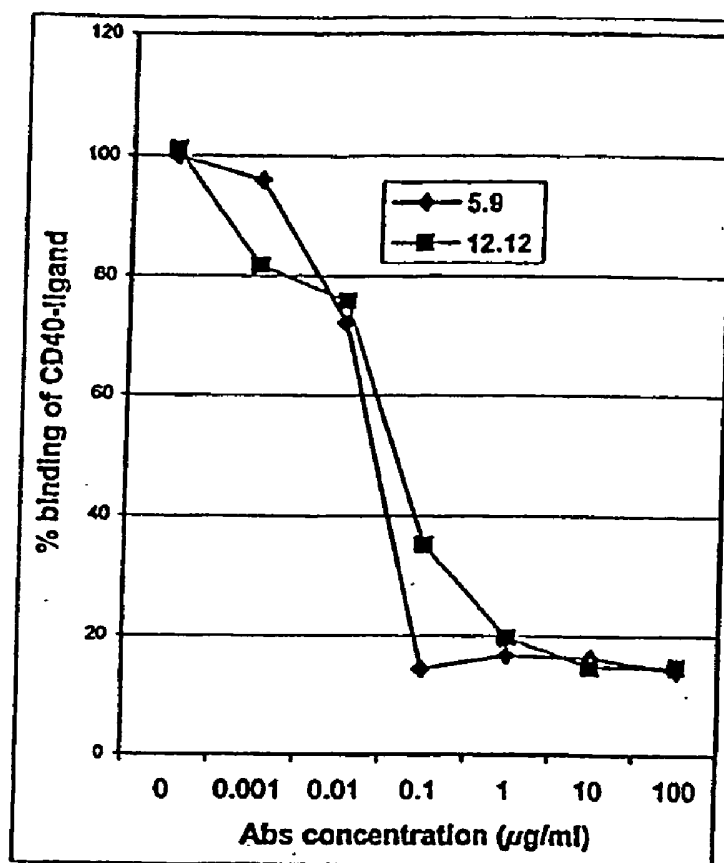


Figura 2A

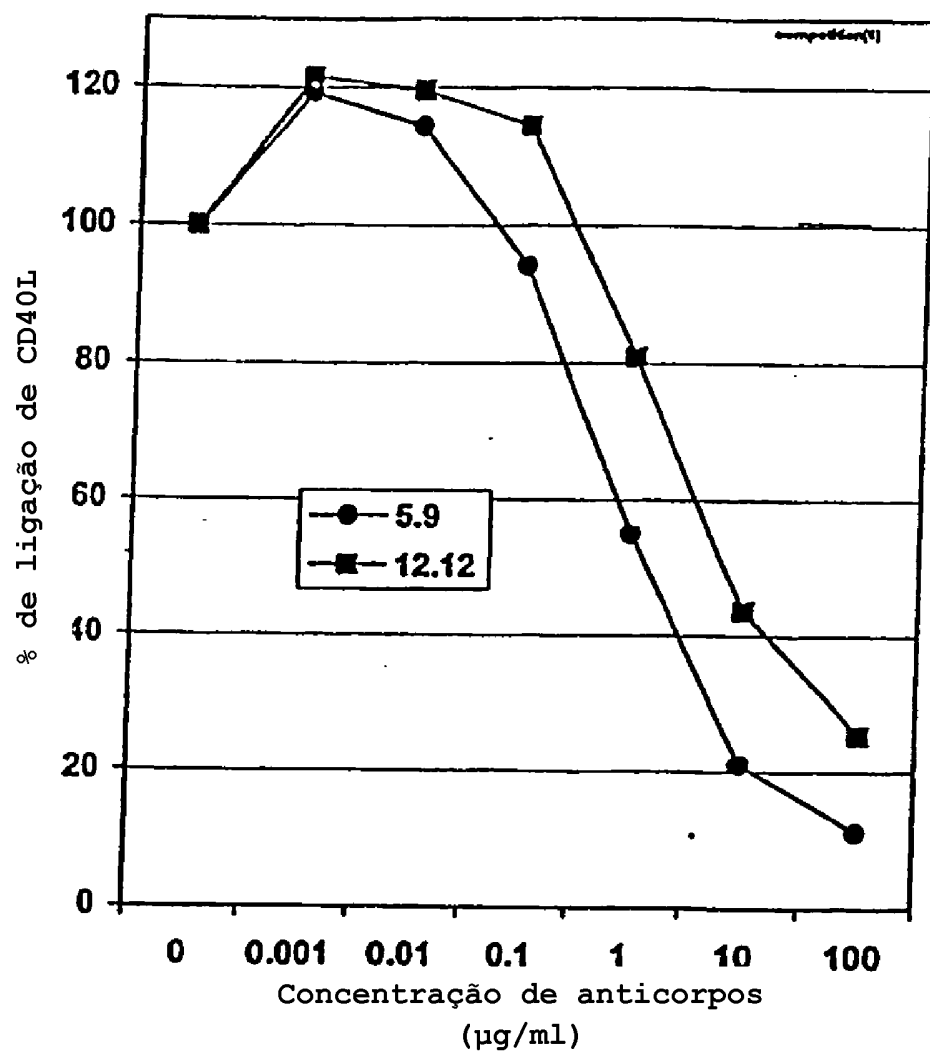


Figura 2B

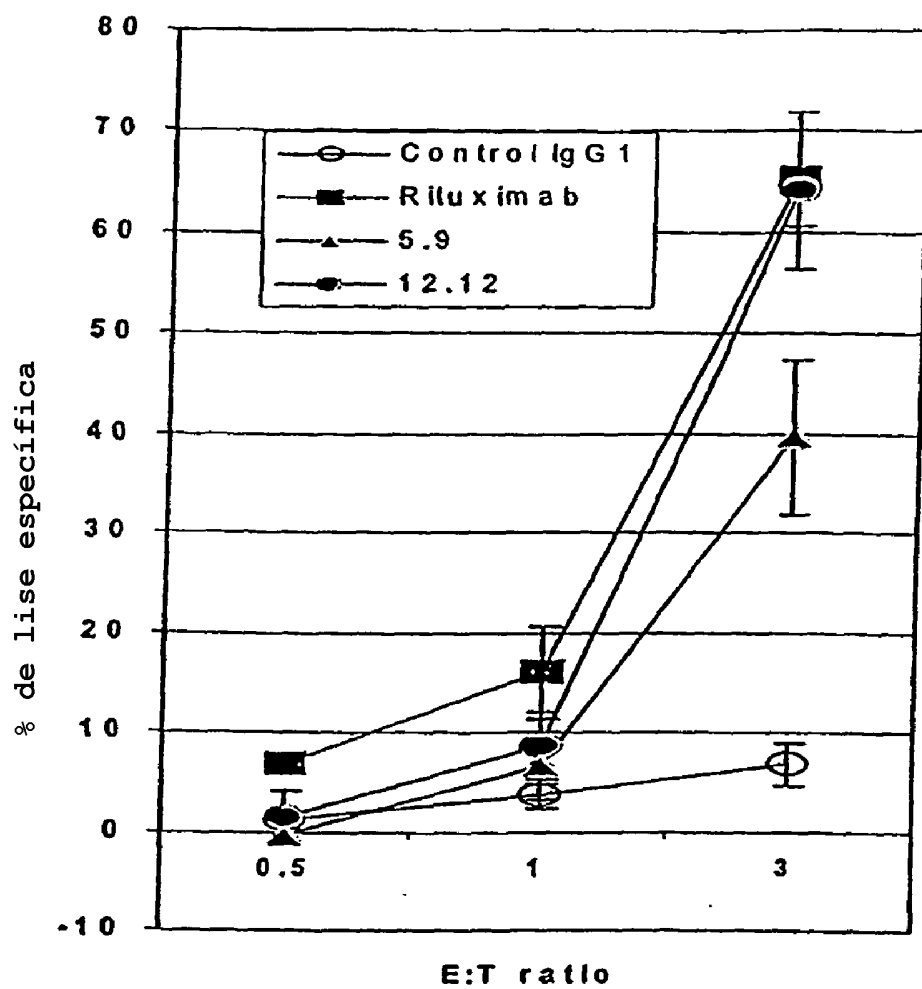


Figura 3A

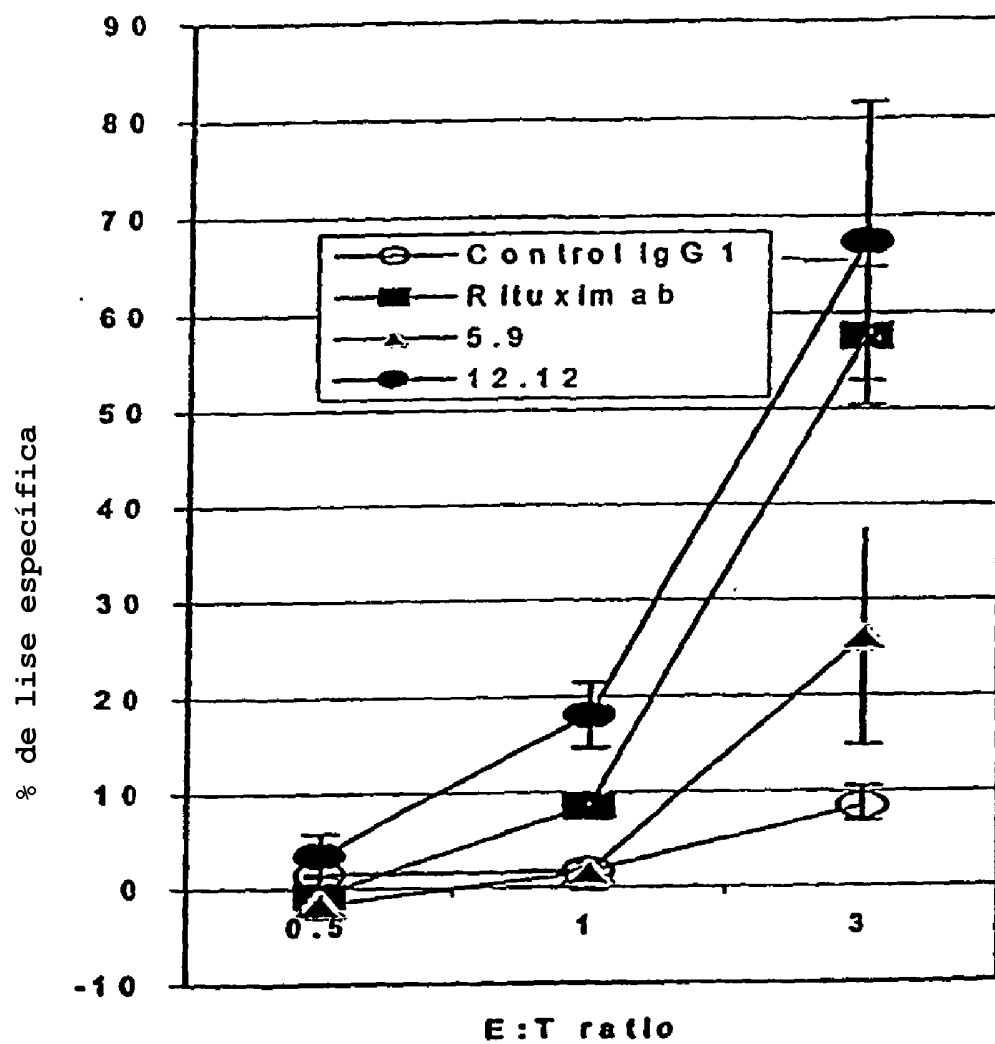


Figura 3B

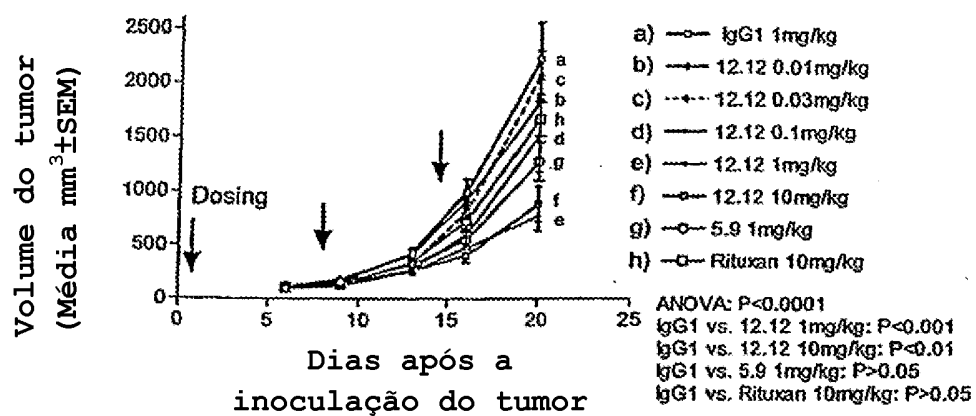


Figura 4

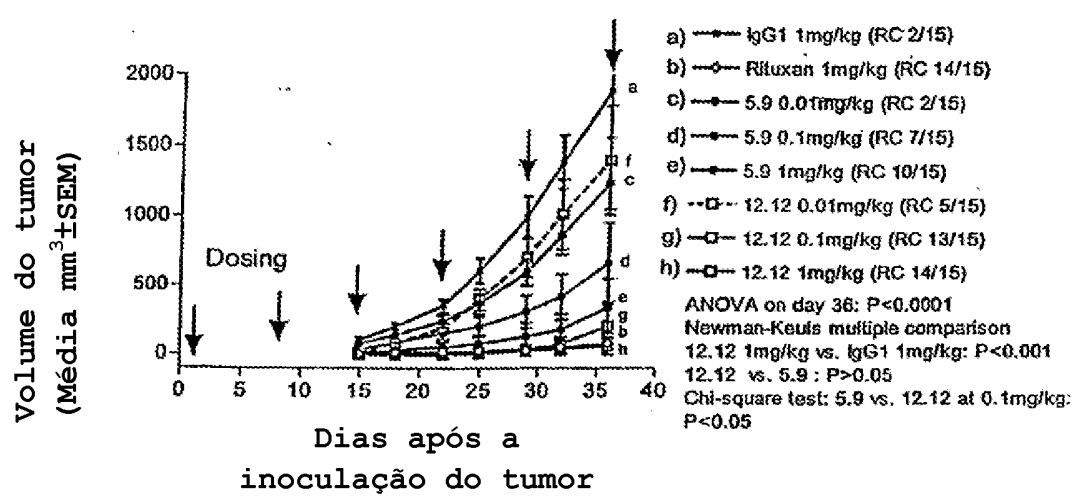


Figura 5

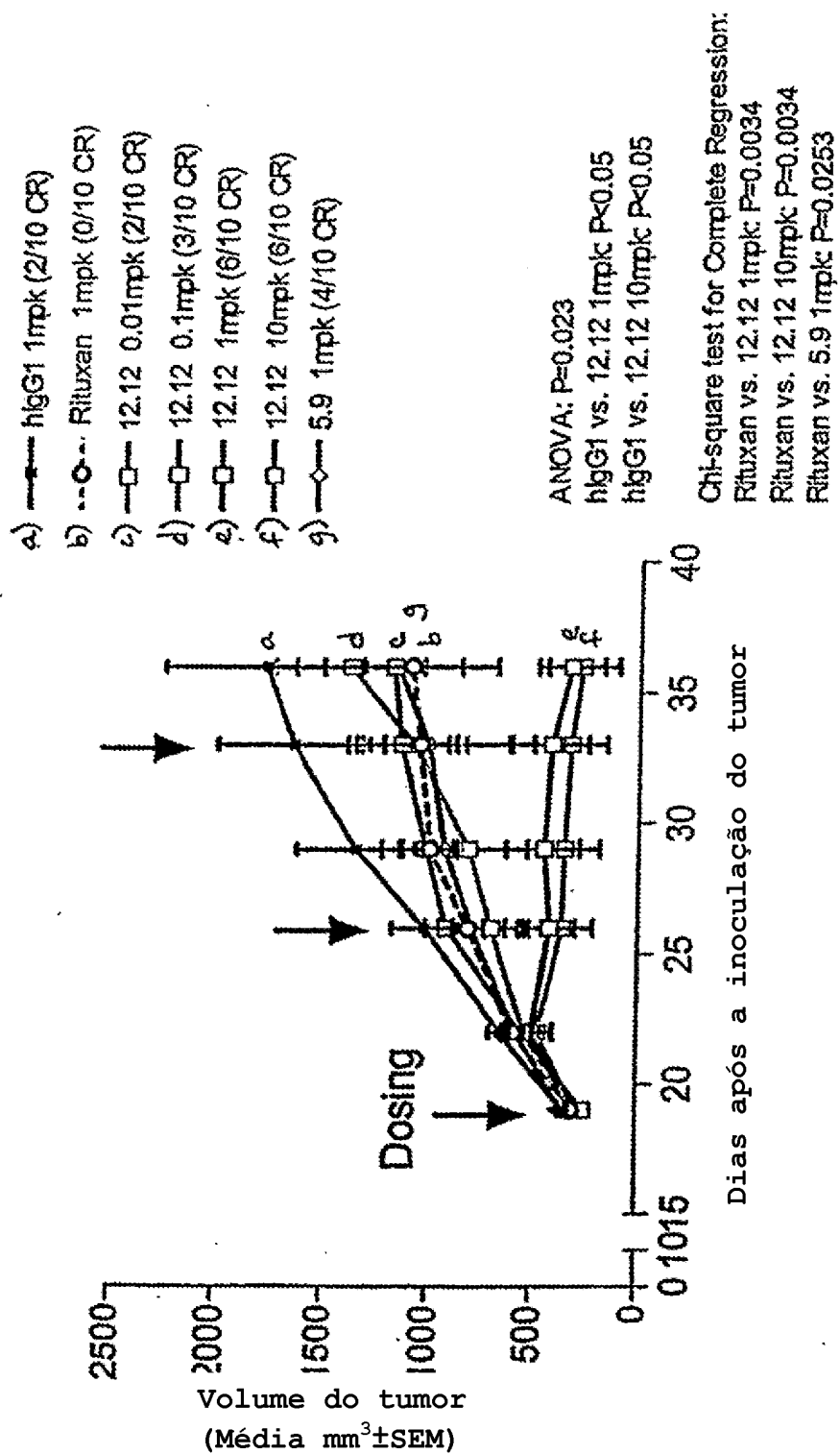


Figura 6

Número de moléculas CD20 e CD40 em células Namalwa e Daudi

[illegible]

	Daudii		Namalwa	
Exp.	CD40	CD20	CD40	CD20
E090403	14403.0	93676.5	3296.4	6200.1
E091003	13214.9	108438.5	3081.5	4788.2
E091103	13702.6	100509.1	3165.7	3988.3
E091203	13278.9	128158.3	3164.9	4618.0
Average	13,649.9	107,695.6	3,177.1	4,898.7
Stdev	546.7	14915.9	88.8	933.4

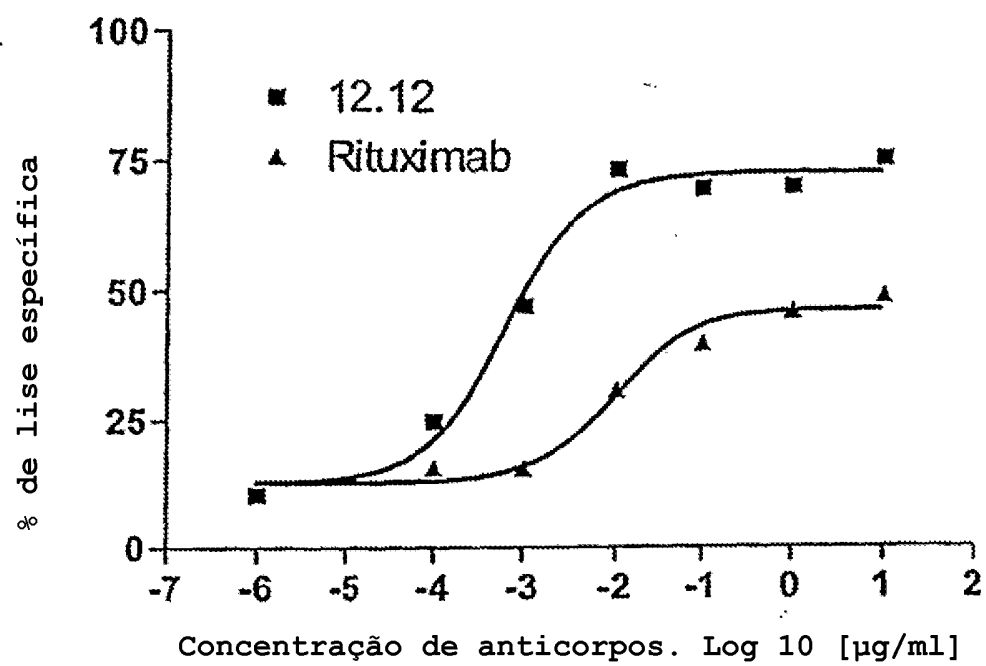


Figura 8

Figura 9A

CHIR 12.12 light chain:

leader:

MALPAQLLGLLMLWVSGSSG

variable:

DIVMTQSPLSLTVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQVLISLGSNRASG
VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQARQTPFTFGPGTKVDIR

constant:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 9B

CHIR-12.12 heavy chain:

leader:

MEFGLSWVFLVAILRGVQC

variable:

QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYEESNRYHAD
SVKGRFTISRDN SKITLYLQMNSLRTEDTAVYYCARDGGIAAPGPDYWGQGTLVTVSS

constant:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

alternative constant region:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTFLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 10A

Sequência de ADN da cadeia leve de CHIR-12-12:

5'atggcgctccctgctcagctcctgggctgctaatagtctgggtctctggatccagtggggatattgtgatgacacagctccactcic
cctgaccgtcacccctggagagccggccctccatctcctgcaggtccagtcagagccctctgtatagtaatggatacaactatttgattg
gtacctgcagaagccaggcagctccacaggctcctgatctcttgggtctaatcgggctccgggtccctgacagggtcagtgga
gtggalcaggcacagatttactgaaaatcagcagagtgaggctgaggatgttgggtttattactgcatgcaagctcgacaaact
ccattcactttcggccctgggaccaaagtgatatacagacgaactgtggctgcaccatctgtctcactctcccgccatctgafgagcagt
tgaatctggaactgctctgtgtgtgctgtgaataactctatccagagaggccaagtacagtggagggtggataacgccctcc
aatcgggttaactccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacacacctacagccacagcagccctgacgtgagcaa
agcagactacgagaacacaaagctacgcctggaagtcacccatcaggggcctgagctcgccgtcacaagagctcaacaggg
gagagtgttag3'

Figura 10B

Sequência de ADN da cadeia pesada de CHIR-12-12 (incluindo
intrões) :

5'atggagtgtgggctgagctgggttttctgtgtatittaaagaggtgtccagtgtcaggtgcagttggtggagtctggggaggcgt
ggccagccctgggagggtccctgagactctcctgtgcagccctctggaftcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccggcaggctc
caggcaaggggctggagtgggtggcagttataatcatatagggaaglaantagataccatgcagactccgtgaaggccogattacca
tcctccagagacaattccaagatcacgtgtatctgcaaatgaacagccctcagaactgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagat
gggggtatagcagcacctgggctgactactggggccagggaacccctggctcaccgtctcctcagcaagtaaccaaggggcccatccgt
cttcccccctggcgcccgctagcaagagcaccctctgggggcacagcgccctgggtgctctggtaaggactacttcccgaaccgg
tgacgtgtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggtgtgcacacctccggctgtctacagtcctcaggactctactccctcag
cagcgtgtgtgaccgtgcccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaaagcccagcaaacccaaggtg
acaagagagttgtgtgagaggccagcacagggaaggagggtgtctgtggaagccaggctcagcgtcctgctggacgcacccg
gctatgcagtccagtcagggcagcaaggcaggccctgtgctcttcacccggaggccctctgcccggcccaatcagctcagg
gagagggtctctgtgcttttcccaggctctgggcaggcacaggctaggtgcccctaaccaggccctgcacacaaaggggcaggt
gctgggtcagacctgccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaaagcccaccccaaggccaaactctccactccc
tcagctcggacacctctctcctccagattccagtaactcccaatctctctgtcagagcccaaatctgtgacaaaactcacacatgc
ccaccgtgcccaggtaagccagcccaggccctgcccctccagctcaaggcgggacaggtgcccctagagtgcctgcacccaggac
aggcccagccgggtgtgtgacacgtccacctccatctctctcagcacctgaactcctggggggaccgtcagctctctcttcccccc
aaaacccaaggacacctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggaogtgagccacgaagacctgaggtca
agttaactgggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaaagacaagccggcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaagtgcaaggctctccaaagccctcccagccc
ccatcgagaaaacctctccaaagccaaggtgggacccgtgggtgctgagggccacatggacagaggccggctcggcccacc
ctgcccctgagagtgtaccgtgtaccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccggg
gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgtcaaaaggctctatccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaa
tgggcagccgggagaacaactacaagaccagccctccgtgctggactccgacggctcctctctctatagcaagctcaccgtggac
aagagcaggtggcagcagggaacgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagccctcc
ctgtctccgggtaatga3'

Figura 11A

CHIR-5-9 de cadeia leve:

leader:

MALLAQLLGLLMLWVPGSSG

variable:

AIVMTQPPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWLQQRPGQPPRLLIYKFFRRLSG
VPDRFSGSGAGTDFTLKISRVEADVGVYYCMQVTQFPHTFGQGTREIK

constant:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figura 11B

CHIR-5-9 de cadeia pesada:

leader:

MGSTAILALLLAVLQGVCA

variable:

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDFRYSP
SFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGTAAGRDYYYYYGMDVWGQGTTVTVS
S

constant:

ASTKGPSVFPLAPASKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

alternative constant region:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 12A

Sequência de codificação para isoforma curta de CD40 humano

```
1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tctgaccgc tgtccatcca
61 gaaccaccca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttcttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcactgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgct catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgtcatctgc ttcgaaaaa
481 tgtcaccctt ggacaaggtc cccaggatcg gctgagagcc ctggtggtga tccccatcat
541 cttcgggatc ctgttgcca tcctcttggg gctggtcttt atcaaaaagg tggccaagaa
601 gccaaccaat aa
```

Figura 12B

Isoforma curta codificada de CD40 humano

```
1 mvrplqcvl wgciltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd ctefteteci
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlglr vqqkgtsed tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtrspgs aespaggdphh
181 lrdpvchplg aglyqkggqe anq
```

Figura 12C

Sequência de codificação para isoforma longa de CD40 humano

```
1 atggttcgtc tgcctctgca gtgcgtcctc tggggctgct tgcagaccgc tgtccatcca
61 gaaccacca ctgcatgcag agaaaaacag tacctaataa acagtcagtg ctgttctttg
121 tgccagccag gacagaaact ggtgagtgac tgcacagagt tcatgaaac ggaatgcctt
181 ccttgcggtg aaagcgaatt cctagacacc tggaacagag agacacactg ccaccagcac
241 aaatactgcg accccaacct agggcttcgg gtccagcaga agggcacctc agaaacagac
301 accatctgca cctgtgaaga aggcctggcac tgtacgagtg aggcctgtga gagctgtgtc
361 ctgcaccgtc catgctcgcc cggctttggg gtcaagcaga ttgctacagg ggtttctgat
421 accatctgcg agccctgccc agtcggcttc ttctccaatg tgcattctgc ttctgaaaaa
481 tgcaccctt ggacaagctg tgagacaaa gacctgggtg tgcaacaggc aggcacaaac
541 aagactgatg ttgtctgtgg tcccaggat cggctgagag ccttggtggt gatccccatc
601 atcttcggga tctgtttgc catctcttg gtgctggtct ttatcaaaaa ggtggccaag
661 aagccaacca ataaggcccc ccacccaag caggaacccc aggagatcaa ttctccgac
721 gatcttctg gctccaacac tgcgtctcca gtgcaggaga cttacatgg atgccaaccg
781 gtcaccacag aggatggcaa agagagtcgc attcagtcg aggagagaca gtga
```

Figura 12D

Isoforma longa codificada de CD40 humano

```
1 mvrplqcvl wgclltavhp epptacrekq ylinsqccsl cpggqklvsd cteftetecf
61 pcgesefldt wnrethchqh kyedpnlglr vqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121 lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf fsnvssafek chpwtscetk dlvvqqagtn
181 ktdvvcgpqd rlralvvipi ifgilfaill vlvfikkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241 dlpgsntaap vqetlhgcqp vtqedgkesr isvqerq
```

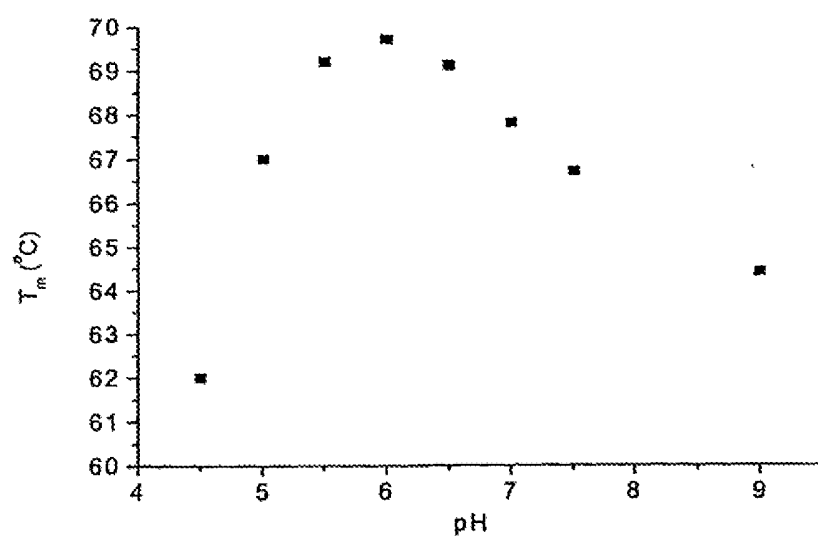


Figura 13