



INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 945465 E**

(51) Classificação Internacional:

**C07K 16/28** (2006.01) **C12N 5/20** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **1993.07.08**

(30) Prioridade(s): **1992.07.09 US 0910222**

**1993.02.09 US 0015147**

**1993.05.28 US 0070158**

(43) Data de publicação do pedido: **1999.09.29**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.09.25**  
**001/2007**

(73) Titular(es):

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

(72) Inventor(es):

**MARK DE BOER** **NL**  
**CLEAH B ONROY** **US**

(74) Mandatário:

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

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS DO CD40 HUMANO**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

<u>EPÍGRAFE:</u>	<u>“ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTAGONISTAS DO CD40 HUMANO”</u>
------------------	---

### **Campo do invento**

O presente invento relaciona-se com anticorpos dirigidos contra moléculas de antigénio associados a membranas. Mais especificamente, o presente invento descreve métodos que permitam a utilização destes antigénios associados a membranas para a imunização de um animal hospedeiro e para o rastreio de anticorpos isolados a partir do animal hospedeiro. Adicionalmente, este invento relaciona-se com novos métodos para o tratamento de doenças do sistema imunológico. Em particular, este invento está relacionado com métodos para a prevenção ou tratamento de doenças mediadas por anticorpos, tais como as doenças mediadas por IgE (alergias) e as doenças auto-imunes, incluindo o lúpus eritematoso sistémico (LES), a cirrose biliar primária (CBP) e a púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

### **Antecedentes do invento**

#### I. Produção de anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais têm-se afirmado como poderosas ferramentas para a pesquisa no campo da Imunologia. De modo geral, os anticorpos monoclonais poderão ser produzidos usando antigénios impuros como imunogénios, desde que exista um ensaio de rastreio que permita distinguir entre os anticorpos dirigidos contra o antigénio de interesse e os anticorpos dirigidos contra outros antigénios presentes na composição imunogénica. Quando o antigénio de interesse corresponde a uma molécula de superfície celular, será desejável que se utilizem células ou fracções de membrana que contenham a molécula de interesse como

imunogénios, de modo a que se conservem os constrangimentos conformacionais proporcionados por um ambiente de membrana.

A imunização de ratinhos com células inteiras suscita geralmente uma forte resposta imune caracterizada pela produção de anticorpos contra um grande número de moléculas diferentes. Esta resposta imune alargada inviabiliza o uso das células contendo o imunogénio num rastreio subsequente da produção de anticorpos específicos por parte de clones de hibridoma derivados de esplenócitos ou de linfócitos de ratinho.

Adicionalmente, quando o antigénio de interesse é expresso a uma baixa densidade, será de prever que se encontre uma frequência relativamente baixa de células B de ratinho específicas para o antigénio. Esta baixa frequência torna necessário o rastreio de um grande número de clones de hibridoma para identificar um clone que produza anticorpos dirigidos contra o antigénio de interesse.

Têm sido utilizados na imunização de ratinhos fibroblastos singénicos murinos, expressando antigénios de superfície de células humanas, para possibilitar a produção de anticorpos específicos (DiSanto et al., 1991). Quando injectados na estirpe de ratinho apropriada, as proteínas antigénicas de fundo presentes nos fibroblastos não deverão ser imunogénicas, para que a resposta imune se oriente contra a proteína recombinante xenogénica. No entanto, esta abordagem requer a construção de células recombinantes específicas para cada espécie ou estirpe na qual é desejada a produção de anticorpos.

## II. A activação de células B e o sistema de Antigénio CD40-Ligando

As células B desempenham um importante papel na resposta imune normal *in vivo*. Uma proteína estranha liga-se a imunoglobulinas da superfície de células B específicas, desencadeando uma cadeia de eventos que inclui a endocitose, processamento, apresentação dos péptidos processados por moléculas de classe II do MHC, e regulação positiva do antigénio B7 à superfície da célula B. Subsequentemente, uma célula T específica liga-se à célula B através do reconhecimento, por parte do receptor das células T (RCT), do antigénio processado que é apresentado pela molécula de classe II do MHC. A estimulação através do RCT inicia a activação das células T e a produção de citocinas pelas células T. A

interacção entre o antigénio CD28 nas células T e o antigénio B7 nas células B poderá proporcionar um segundo sinal para a activação mais completa da célula T, resultando num elevado nível de secreção de citocinas. Adicionalmente, o ligando de CD40, que não é expresso em células T humanas em repouso, é alvo de regulação positiva à superfície da célula T quando os sinais acima referidos são recebidos. A célula B é então estimulada pelo ligando de CD40 através do antigénio CD40 presente à superfície da célula B, e ainda através de citocinas, causando a maturação da célula B até plasmócito secretor de elevadas concentrações de imunoglobulina solúvel.

Há alguns anos atrás, Zubler et al., J. Immunol. (1985) 134:3662, observou que um subclone mutante da linha celular EL-4 de timoma de rato, designado por EL4B5, tinha a capacidade de estimular fortemente as células B de origem humana e murina a proliferar e a diferenciar-se até plasmócitos secretores de imunoglobulinas *in vitro*. Verificou-se que esta activação era independente do antigénio e que não se restringia ao sistema MHC. Para que se obtivesse uma estimulação óptima das células B humanas era necessária a presença de sobrenadante de células T humanas activadas, mas também se verificou uma resposta das células B quando as células EL4B5 foram pré-activadas com 13-acetato de forbol-12-miristato (PMA) ou IL-1. Zubler et al., Immunological Reviews (1987) 99:281; e Zhang et al., J. Immunol. (1990) 144:2955. A activação das células B neste sistema de cultura é eficiente – as experiências de diluição limitante demonstraram que a maioria das células B humanas pode ser activada até à proliferação e diferenciação até células secretoras de anticorpos. Wen et al., Eur. J. Immunol. (1987) 17:887.

O mecanismo através do qual estas células EL-4 mutantes activam as células B humanas e murinas não foi ainda elucidado. No entanto, sabe-se já que o contacto célula-célula é necessário para que ocorra a activação de células B induzida por células EL4B5. Em primeiro lugar, as células B não proliferam na presença de sobrenadante das células EL4B5 estimuladas por PMA. Zubler et al. (1985) *supra*. Em segundo lugar, as células B não proliferam quando uma membrana de filtro semi-permeável as separa das células EL4B5 tratadas por PMA. Zhang et al., *supra*. Os anticorpos contra LFA-1 de rato, LFA-1 humano ou LFA-3 humano e os

anticorpos contra moléculas de classe II do MHC murino ou humano não inibem a proliferação de células B humanas ou murinas induzida pelas células EL4B5. Zubler et al. (1987) e Zhang et al., supra.

O antigénio CD40 é uma glicoproteína expressa à superfície das células B. Durante a diferenciação das células B, a molécula é inicialmente expressa em células pré-B, desaparecendo então da superfície celular quando a célula B se torna um plasmócito. O crosslinking das moléculas de CD40 com os anticorpos anti-CD40 medeia diversos efeitos a nível das células B. Sabe-se que o antigénio CD40 se encontra relacionado com o receptor do factor de crescimento dos nervos (NGF) e com o receptor do factor alfa de necrose de tumor (TNF- $\alpha$ ) humanos, o que sugere que o CD40 constitui um receptor para um ligando que desempenha funções importantes na activação das células B.

Foi identificado um ligando do CD40 à superfície das células T activadas. Fenslow et al., J. Immunol. (1992) 149:655; Lane et al., Eur.J. Immunol. (1992) 22:2573; Noelle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6550. A clonagem do cDNA do ligando de CD40 revelou uma molécula com características de uma glicoproteína transmembranar de tipo II exibindo homologia com o TNF- $\alpha$ . Armitage et al., Nature (1992) 357:80 e Spriggs et al., J. Exp. Med. (1992) 176:1543. O domínio extracelular do ligando de CD40 contém dois resíduos de arginina proximais relativamente à região transmembranar, proporcionando um potencial local de corte proteolítico que poderia dar origem a uma forma solúvel do ligando. A expressão do ligando recombinante de CD40 demonstrou que esta molécula tem a capacidade de estimular a proliferação de células B purificadas e, em combinação com a IL-4, mediar a secreção de IgE. Armitage et al. e Spriggs et al., supra. Tem sido referida que a existência de anomalias no gene que codifica para o ligando de CD40, resultando na ausência de uma molécula funcional à superfície das células T activadas, é responsável pela ocorrência do síndrome de hiper-IgM ligado ao cromossoma X, um distúrbio raro que se caracteriza pela incapacidade que estes pacientes manifestam para produzir concentrações normais de outros isotipos de anticorpo que não o IgM. Allen et al., Science (1993) 259:990; e Korthäuer et al., Nature (1993) 361:539.

Todos os anticorpos anti-CD40 conhecidos neste campo técnico manifestam um efeito estimulador sobre as células B humanas. O crosslinking da molécula de CD40 à superfície da célula B usando anticorpos anti-CD40 conhecidos medeia diversos efeitos a nível das células B. Os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD40 têm a capacidade de induzir a adesão intercelular, a proliferação e, em combinação com certas citocinas, a maturação até células secretoras de anticorpos. Por exemplo, verificou-se que os mAbs anti-CD40 conhecidos emulam os efeitos das células T helper na activação de células B. Quando apresentados por células aderentes que expressam FcγRII, estes anticorpos induzem a proliferação de células B. J. Banchemer et al., *Science* (1989) 251:70. Adicionalmente, os mAbs anti-CD40 conhecidos podem substituir o sinal das células T helper para a secreção de IgM, IgG e IgE na presença de IL-4. Gascan et al., *J. Immunol.* (1991) 147:8. Ainda, os mAbs anti-CD40 conhecidos têm a capacidade de evitar a morte celular programada (apoptose) de células B isoladas de nódulos linfáticos.

O presente invento proporciona um método para a geração de células produtoras de anticorpos monoclonais, sendo que estes anticorpos exibem especificidade de ligação para uma molécula específica da superfície celular; este método ultrapassa as limitações dos métodos acima descritos. O invento proporciona ainda métodos para o uso de anticorpos anti-CD40 que (1) têm a capacidade de inibir a resposta das células B e (2) podem ser usados para prevenir ou tratar doenças mediadas por anticorpos.

### **Sumário do Invento**

O invento baseia-se na descoberta de anticorpos anti-CD40 que não estimulam o crescimento e a diferenciação das células B humanas. Por contraste, estes anticorpos têm a capacidade de inibir as respostas das células B humanas a concentrações relativamente baixas. Deste modo, estes anticorpos poderão ser usados para prevenir ou tratar doenças ou distúrbios que são mediados por anticorpos produzidos pela resposta das células B humanas. Estes anticorpos reconhecem igualmente novos epitopos no antígeno CD40 que são úteis para a modulação da resposta das células B.

Deste modo, este invento fornece um anticorpo monoclonal que tem a capacidade de se ligar a um antígeno CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana, sendo que a ligação do anticorpo ao antígeno CD40 evita o crescimento ou a diferenciação da célula B.

Adicionalmente, os anticorpos poderão ser usados num método para a prevenção ou tratamento de uma doença mediada por anticorpos num paciente, compreendendo este método a administração, a um paciente que deste tratamento necessite, de uma quantidade terapêuticamente eficaz, num excipiente farmacologicamente aceitável, de um anticorpo monoclonal possuindo a capacidade de se ligar a um antígeno CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana, sendo que a ligação do anticorpo ao antígeno CD40 evita o crescimento ou a diferenciação da célula B.

Ainda, os anticorpos poderão ser usados num método para a prevenção ou tratamento de uma doença mediada por IgE, tal como uma alergia, num paciente, compreendendo este método a administração, a um paciente que deste tratamento necessite, de uma quantidade terapêuticamente eficaz, num excipiente farmacologicamente aceitável, de um anticorpo monoclonal possuindo a capacidade de se ligar a um antígeno CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana, sendo que a ligação do anticorpo ao antígeno CD40 evita o crescimento ou a diferenciação da célula B.

Adicionalmente, os anticorpos poderão ser usados num método para a prevenção ou tratamento de uma doença auto-imune mediada por anticorpos num paciente, compreendendo este método a administração, a um paciente que deste tratamento necessite, de uma quantidade terapêuticamente eficaz, num excipiente farmacologicamente aceitável, de um anticorpo monoclonal possuindo a capacidade de se ligar a um antígeno CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana, sendo que a ligação do anticorpo ao antígeno CD40 evita o crescimento ou a diferenciação da célula B. As doenças auto-imunes particulares contempladas no tratamento por este método incluem o lúpus eritematoso sistémico (LES), a cirrose biliar primária (CBP) e a púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

Em formas de realização particularmente preferidas para os objectivos do invento acima descritos, o anticorpo monoclonal anti-CD40 é produzido pelos

métodos acima descritos e corresponde a 5D12 (ATCC HB 11339) ou 3C6 (ATCC HB 11340).

### **Breve Descrição das Figuras**

A Figura 1A apresenta um esquema do vector de transferência de baculovírus pAcC8 e a sequência dos locais múltiplos de clonagem. A Figura 1B apresenta uma representação em esquema da criação de células Sf9 que expressam anticorpo CD40 humano de acordo com o método do presente invento.

A Figura 2 apresenta as sequências dos primers de reacção em cadeia por polimerase que são usados na preparação de regiões codificantes para antigénios CD40 humanos. Estes primers foram construídos com base nas sequências codificantes completas de DNA publicadas para o CD40 (Stamenkovic et al., 1989).

A Figura 3 mostra os resultados de ensaios de ELISA que examinam a reacção do anticorpo monoclonal anti-(CD40) S2C6 com células Sf9 que expressam CD40 e com células Sf9 que expressam B7.

As Figuras 5A-C apresentam os resultados da coloração fluorescente de células aplicada à linha celular ARC de células B transformadas por EBV que expressam CD40 ou B7.

As Figuras 6A-F apresentam os resultados de ensaios de competição usando a coloração fluorescente da linha celular ARC de células B transformadas por EBV que expressam CD40 e B7, assim como os antigénios solúveis CD40 e B7.

A Figura 7A compara a capacidade de três novos mAbs anti-CD40 e de um mAb anti-CD40 antigo para co-estimular a proliferação de células B humanas induzida por anti-IgM. A Figura 7B repete a experiência da Figura 5A na presença de interleucina-2 recombinante (rIL-2).

A Figura 8 mostra a capacidade de três novos mAbs anti-CD40 para inibir a proliferação de células B humanas induzida pela co-estimulação com anti-IgM imobilizado e com o mAB anti-CD40 52C6.

A Figura 9 apresenta o efeito de três novos mAbs anti-CD40 sobre a proliferação de células B humanas induzida por células EL4B5.

A Figura 10 apresenta o efeito de um CD40 solúvel (hCD40.µ) sobre a proliferação de células B humanas induzida por células EL4B5.

As Figuras 4A e 4B mostram o efeito de um novo mAb anti-CD40 5D12 sobre a produção de imunoglobulinas por células B humanas induzida por células T humanas.

### **Descrição Detalhada do Invento**

O invento aqui descrito baseia-se em trabalhos previamente publicados e em pedidos de patente pendentes. Como exemplo, estes trabalhos consistem em artigos científicos, patentes ou pedidos de patente pendentes.

#### **I. Definições:**

Tal como aqui são usados, os termos “antígeno associado a membrana”, “molécula de superfície celular” e “antígeno de superfície celular” referem-se a uma proteína, polipéptido ou péptido em que pelo menos uma porção antigénica da proteína, polipéptido ou péptido é exposta à superfície de uma membrana biológica, incluindo esta proteína, polipéptido ou péptido uma ligação covalente a uma ou mais das seguintes porções moleculares: uma ou mais porções moleculares de açúcar simples ou complexo (tal como numa glicoproteína), porções moleculares lipídicas (tal como numa lipoproteína), uma combinação de porções moleculares de açúcares e de lípidos, ou outras modificações pós-traducionais.

“Proteínas” são tipicamente cadeias longas de polímeros baseados em aminoácidos (“polipéptidos”). As proteínas poderão ser compostas por uma, duas ou mais cadeias polipeptídicas e poderão ainda conter um outro tipo de substância em associação à(s) cadeia(s) polipeptídica(s), tal como hidratos de carbono. O intervalo de dimensões das proteínas é bastante vasto, abrangendo desde (um número arbitrário de) 5.000 até diversas centenas de milhar de g/mole. O número de 5.000 corresponde à presença de aproximadamente 40-45 aminoácidos. As proteínas mais pequenas do que cerca de 5.000 g/mole são tipicamente designadas por polipéptidos, ou simplesmente por péptidos (Bohinski).

Tal como aqui é usado, o termo “anticorpo” refere-se a anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, anticorpos humanizados, anticorpos de cadeia simples, e seus fragmentos tais como os fragmentos  $F_{ab}$ ,  $F_{(ab)2}$ ,  $F_v$  e outros que mantêm a função de ligação ao antígeno que é característica do anticorpo original.

Tal como aqui é usado, o termo “anticorpo monoclonal” refere-se a uma composição de anticorpo que possui uma população homogênea de anticorpos. O termo não é alvo de limitação nem no que diz respeito à espécie ou à fonte do anticorpo, nem relativamente ao seu modo de preparação. O termo abrange imunoglobulinas completas assim como fragmentos como  $F_{ab}$ ,  $F_{(ab')_2}$ ,  $F_v$  e outros que mantêm a função de ligação ao antígeno que é característica do anticorpo original. Poderão ser usados no âmbito deste invento anticorpos monoclonais de qualquer espécie de mamífero. Na prática, no entanto, os anticorpos serão tipicamente de rato ou de origem murina devido à maior disponibilidade das linhas celulares de rato ou murinas para uso na produção das linhas celulares híbridas ou hibridomas que são necessários para a produção de anticorpos monoclonais.

Tal como aqui é usado, o termo “anticorpos humanizados” significa que pelo menos uma porção das regiões estruturais de uma imunoglobulina deriva de sequências de imunoglobulinas humanas.

Tal como aqui é usado, o termo “anticorpo de cadeia simples” refere-se a anticorpos preparados através da determinação dos domínios de ligação (cadeias leves e pesadas) de um anticorpo e do fornecimento de uma porção molecular de junção que permite preservar a função de ligação. Tal forma, basicamente, um anticorpo radicalmente abreviado, possuindo do domínio variável apenas a parte que é necessária para a ligação ao antígeno. Os processos de determinação e de construção de anticorpos de cadeia simples encontram-se descritos na Patente dos EUA N°. 4.946.778, de Ladner et al.

Tal como aqui é usado, o termo “molécula que se liga ao antígeno B7” indica uma molécula que tem a capacidade de formar um complexo com o antígeno B7 no seio de um ambiente no qual as outras substâncias presentes não se encontram complexadas com o antígeno B7. O complexo é formado de um modo que bloqueia a via normal de transdução de sinal do antígeno B7 através do antígeno CD28 ou CTLA4. As moléculas que se ligam ao antígeno B7 incluem os anticorpos CD28, CTLA4, CTLA4Ig e anti-B7.

O termo “epitopo do antígeno CD40”, tal como aqui é usado, refere-se a uma molécula que exhibe imunoreactividade com os anticorpos monoclonais anti-CD40 deste invento, excluindo o próprio antígeno CD40. Os epitopos do antígeno CD40

poderão compreender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos e outras moléculas, mas para os fins do presente invento estes corresponderão mais vulgarmente a proteínas, oligopéptidos curtos, emuladores de oligopéptidos (i.e., compostos orgânicos que emulam as propriedades de ligação ao anticorpo próprias do antigénio CD40), ou combinações dos mesmos. Os emuladores de oligopéptidos apropriados encontram-se descritos, entre outras fontes, no Pedido de Patente PCT US91/04282.

## II. Produção de Anticorpos contra Moléculas de Antigénio Associadas a Membranas

Esta secção descreve um método para a produção e selecção de anticorpos contra uma molécula de superfície celular, usando células de insecto transfectadas como imunogénio. As células de insecto transfectadas de acordo com o presente invento poderão igualmente ser usadas em ensaios de rastreio.

De acordo com uma das suas formas de realização, o invento inclui um método para a produção de anticorpos policlonais contra um antigénio de superfície celular. O método envolve os seguintes passos: o passo de imunização, que inclui (i) a selecção e o isolamento de uma sequência codificante de ácido nucleico que codifica para o antigénio de interesse, (ii) a inserção da sequência codificante num vector de expressão de baculovírus de modo a obter uma expressão eficiente da sequência codificante, (iii) a transfecção do vector de expressão para uma linha celular de insecto de modo a obter células recombinantes de insecto que expressam o antigénio seleccionado, e (iv) a imunização de um animal hospedeiro com as células de insecto que expressam o antigénio associado a membrana.

Após a imunização, o soro do animal hospedeiro é rastreado quanto à presença de células, que não as células de insecto, que expressem o antigénio de interesse. Alternativamente, poderão usar-se para o rastreio do soro fracções de membrana que contenham o antigénio de interesse ou, em alguns casos, os próprios antigénios purificados produzidos por via recombinante. Tipicamente, são rastreados (a) o soro de pré-intervenção, (b) o soro de um animal hospedeiro imunizado com células de insecto que não expressam o antigénio de interesse, e (c) o soro do animal hospedeiro imunizado com as células recombinantes de insecto. A

presença de anticorpos especificamente dirigidos contra o antígeno de interesse é indicada por reacções negativas com os soros (a) e (b), e reacções positivas com o soro (c).

De acordo com outra das suas formas de realização, o invento inclui um método para a geração de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais contra uma proteína da superfície celular. O método envolve os passos (i) a (iv) acima descritos. Após a imunização do animal hospedeiro com as células recombinantes de insecto, as células produtoras de anticorpos são isoladas a partir do animal. Numa forma de realização preferida para o invento, estas células produtoras de anticorpos são usadas para gerar células de hibridoma, as quais são clonadas e usadas para a produção de anticorpos monoclonais. Os sobrenadantes destas células de hibridoma são rastreados quanto à produção de anticorpos específicos, por exemplo, usando um ensaio de rastreio baseado em células como abaixo se descreve.

#### A. Isolamento de Sequências Codificantes para Moléculas de Membrana

A sequência de ácido nucleico codificante para um antígeno associado a membrana seleccionado poderá ser isolada com base em sequências conhecidas de aminoácidos e/ou de DNA codificando para o componente proteico do antígeno. A sequência codificante poderá ser isolada a partir de fontes biológicas através de procedimentos convencionais (Ausubel et al.; Maniatis et al.; Sambrook et al.) (p.ex., hibridização, hibridização diferencial, clonagem e rastreio de placas, etc.). Alternativamente, poderão preparar-se sequências sintéticas de oligonucleótidos codificando para o antígeno de interesse, usando os sintetizadores automatizados de oligonucleótidos comercialmente disponíveis ou adquirindo estes oligonucleótidos, por exemplo, à empresa Synthetic Genetics (San Diego, CA). No caso de grandes sequências codificantes, a sequência codificante do oligonucleótido poderá ser sintetizada através de uma série de passos de clonagem envolvendo um conjunto sequencial de múltiplos fragmentos de oligonucleótidos correspondendo à sequência codificante (Crea; Yoshio et al.; Eaton et al.). As sequências codificantes dos oligonucleótidos poderão ser amplificadas e isoladas através de procedimentos de recombinação convencionais (Maniatis et al.; Ausubel et al.) ou por reacção em

cadeia por polimerase (Mullis; Mullis et al.). Quando a sequência do antígeno associado a membrana é conhecida no todo ou em parte, poderá isolar-se uma sequência codificante específica do antígeno. Tipicamente, a sequência codificante do antígeno é isolada a partir de uma biblioteca de cDNA, gerada pela inserção de fragmentos de DNA provenientes de uma fonte seleccionada num vector. A biblioteca de cDNA contendo fragmentos de DNA de uma fonte contendo antígenos de membrana poderá ser construída usando moléculas de cDNA que correspondem a fragmentos arbitrários gerados a partir de moléculas-alvo de RNA. Uma tal biblioteca de cDNA será geralmente construída usando um sistema bacteriano (tal como o lambda gt10 (Promega, Madison WI)), mas poderá ainda ser construída num sistema de expressão de levedura ou eucariótico recorrendo a técnicas convencionais (Ausubel).

A biblioteca é pesquisada (geralmente por hibridização; Ausubel et al.; Maniatis et al.) quanto à presença de uma sequência de DNA correspondente a um antígeno associado a membrana, usando geralmente como sonda um oligonucleótido que possui uma sequência conhecida ou de consenso que é hibridizável com a região codificante do antígeno. A sonda poderá incluir diversas porções moleculares para detecção, incluindo radioisótopos, biotina e digoxigenina. Alternativamente, quando não está disponível uma sequência de sonda de ácido nucleico, o rastreio de clones para a detecção da região codificante de interesse poderá ser efectuado recorrendo, por exemplo, a imunorastreio (usando o sistema de lambda gt11 "PROTO-CLONE", Promega; Young et al.; Huynh et al).

As regiões codificantes são isoladas a partir de isolados recombinantes que fornecem sinais positivos (por hibridização ou por rastreio imunológico). Tipicamente, os fragmentos de DNA contendo as regiões codificantes são isolados por digestão com enzimas de restrição seguida de fraccionamento por dimensões e purificação dos fragmentos. Tais regiões codificantes de ácidos nucleicos poderão então ser processadas para inserção num vector de transferência de baculovírus, tal como o vector pAcC8 (Figura 1A), conforme descrito na parte B, abaixo. Encontram-se disponíveis outros vectores de baculovírus adequados, incluindo os vectores pVL1393 (Luckow et al.) e pAC3T3 (Summers et al.).

Alternativamente, as sequências codificantes poderão igualmente ser isoladas usando a amplificação por reacção em cadeia por polimerase (PCR) (Mullis; Mullis et al.). Os primers úteis para a PCR poderão derivar de qualquer sequência de ácido nucleico conhecida. Se a sequência exacta não for conhecida, poderão usar-se primers degenerados (Mullis; Mullis et al.). Tipicamente, estes primers correspondem a duas sequências de ácidos nucleicos que consistem em 8 ou mais nucleótidos colineares, sendo que as duas sequências se encontram separadas por uma certa distância definida, de modo a gerar uma sequência-alvo (Exemplo 1), e são complementares a cadeias opostas.

Um ciclo típico de PCR envolve os seguintes passos: fusão a elevada temperatura, seguida de annealing, e extensão. As reacções são repetidas por 25-30 ciclos. Os produtos de PCR poderão ser digeridos por enzimas de restrição e separados por electroforese usando um gel preparativo de agarose a 1,5%. Os fragmentos amplificados específicos de clone são tipicamente identificados por electroforese em gel para fraccionamento por dimensões. Os fragmentos de DNA específicos de clone são então recuperados a partir do gel usando, por exemplo, o sistema "GENE CLEAN" (Bio 101, La Jolla, CA). Se necessário, o DNA poderá ser extraído com fenol e/ou fenol:clorofórmio (1:1). O DNA isolado é precipitado com etanol. Após a precipitação, o DNA é usado para inserção em vectores de expressão de baculovírus.

A criação de células Sf9 expressando CD40 humano é apresentada em esquema na Figura 1B. Tal como apresentado, é isolado RNA de uma população de esplenócitos humanos transformados pelo vírus de Epstein-Barr (EBV), usando técnicas padronizadas (Chirgwin et al.). O RNA total é convertido em cDNA recorrendo a um priming com hexâmeros arbitrários, de acordo com os métodos estabelecidos e tal como descrito em detalhe no Exemplo 1. A molécula de DNA codificando para as moléculas de interesse de antígeno associado a membrana é gerada por amplificação por PCR, usando primers directo e reverso possuindo locais de restrição para clonagem a nível das suas extremidades 5'. Tais primers de cDNA, usados na preparação de regiões codificantes para o CD40 humano, são apresentados na Figura 2. Estes primers foram construídos tendo como base as

sequências codificantes completas de DNA publicadas para o CD40 (Stamenkovic et al., 1989).

Prosseguindo na referência à Figura 1B, o cDNA é misturado com um primer directo e com um primer reverso, na presença de uma polimerase termoestável, tal como a polimerase de *Thermus aquaticus*, uma mistura equimolar de desoxinucleótidos e um sistema-tampão (Exemplo 1). A mistura é submetida a amplificação num termociclador, e os produtos de PCR obtidos são subclonados no poli-linker de um vector de transferência de baculovírus. Um destes vectores, o pAcC8, encontra-se representado em diagrama na Figura 1A. Para colocar em prática o presente invento, qualquer um de diversos vectores de transferência de baculovírus contendo locais únicos de restrição para endonucleases a jusante do promotor da polihedrina (Miller) poderá ser utilizado: para o vírus de polihedrose nuclear de *Autographica californica* (AcNPV) (Wu et al.; Matsuura et al.; Takehara et al.) ou o vírus de polihedrose nuclear de *Bombyx mori* (pBmNPV) (Nyunoya et al.; Sekine et al.).

Antes de se efectuar a sua expressão em baculovírus, as inserções de DNA são tipicamente avaliadas quanto à existência de mutações induzidas por PCR através de análise por sequenciação.

#### B. Inserção de uma Sequência Codificante de Antígeno num Vector de Baculovírus

A inserção da região que codifica para o antígeno associado a membrana num vector de baculovírus é efectuada de acordo com procedimentos estabelecidos (Ausubel et al.; Maniatis et al.; Sambrook et al.). Criaram-se por PCR cDNAs de extensão completa codificando para B7 humano e CD40 humano usando primers com locais de restrição para clonagem. O molde para amplificação por PCR correspondeu a cDNA originado a partir de RNA de células B de baço humano transformadas por EBV. Abreviadamente, uma região de DNA codificante isolada é ligada ao vector de transferência de baculovírus ou a um plasmídeo, tal como o plasmídeo pAcC8, de tal modo que a região codificante do antígeno associado a membrana se encontre a jusante do promotor de poliedro. O codão ATG do gene de poliedro foi submetido a mutação para ATT (Figura 1A) para evitar a iniciação da tradução em clones recombinantes que não possuam uma sequência codificante

com um ATG funcional. O DNA plasmídico resultante é co-transfectado com baculovírus de tipo selvagem (AcNPV) em células do insecto *Spodoptera frugiperda* (células Sf9) de modo a criar partículas virais recombinantes, resultantes da recombinação in vivo entre o vírus de tipo selvagem e o vector recombinante que transporta o gene codificando para o antigénio associado a membrana.

Os Exemplos 1-2 descrevem o isolamento de vectores recombinantes de baculovírus contendo segmentos heterólogos de DNA: pAcCD40 (codificando para uma molécula CD40 de extensão completa), pAcCD40-ED/Glu (codificando para o domínio extracelular de CD40), pAcB7 (codificando para uma molécula B7 de extensão completa) e pCcB7-ED/Glu (codificando para o domínio celular da molécula de B7).

### C. Infeção de Células de Insecto com Vectores de Baculovírus

Os vírus recombinantes acima descritos foram então usados para co-infectar células de insecto (Exemplo 2). Estas células expressaram então os antigénios codificados pelas inserções de DNA heterólogo.

Infectaram-se células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*; Summers et al.), a uma densidade de  $10^6$  células/ml, com vírus recombinante. As células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante foram identificadas e procedeu-se à purificação deste clone (Summers et al).

As células expressando o antigénio de superfície celular foram recolhidas após 48 horas e foram usadas para a imunização de animais hospedeiros. Para a produção das proteínas recombinantes secretadas, as células foram recolhidas após 72 horas de cultura.

A expressão das moléculas recombinantes à superfície das células Sf9 (Exemplo 3) foi testada usando um sistema de ELISA (Harlow et al.). A Figura 3 mostra que o anticorpo monoclonal anti-(B7) BB-1 reagiu apenas com células Sf9 infectadas com vírus AcB7, mas não com células Sf9 expressando o antigénio CD26 humano. Por contraste, o anticorpo monoclonal anti-(CD26) Ta-1 reagiu apenas com as células Sf9 que expressavam o antigénio CD40. A Figura 4 mostra que o anticorpo monoclonal anti-(CD40) S2C6 reagiu apenas com células Sf9 que expressavam o antigénio CD40, mas não com células Sf9 que expressavam o

antigénio B7. Estes resultados demonstram a especificidade do método do presente invento na produção de antigénios associados a membrana seleccionados no sistema de baculovírus. Estes resultados indicam igualmente que os antigénios associados a membrana se encontram expostos à superfície das células Sf9.

Adicionalmente, estes resultados sugerem que as células Sf9 expressando antigénios associados a membrana seleccionados poderão ser usadas no rastreio de soros e de sobrenadantes de hibridoma quanto à presença de anticorpos reactivos contra o antigénio seleccionado.

#### D. Injecção de Células de Insecto Expressando o Antigénio Associado a Membrana num Animal Hospedeiro

Os animais hospedeiros adequados para a produção de anticorpos policlonais incluem, por exemplo, coelhos, cabras, ovelhas, porquinhos da Índia, chimpanzés e cães. Uma vantagem do presente invento é a de que os adjuvantes de imunização não são geralmente necessários.

Os animais hospedeiros adequados para uso na produção de anticorpos monoclonais incluem normalmente ratos, hamsters e ratinhos. No entanto, nos casos em que se torna desejável a produção de anticorpos imunologicamente mais próximos dos humanos, as fontes de tais anticorpos poderão incluir primatas superiores, tal como os chimpanzés. A fusão com um parceiro de fusão de heteromioma poderá ser usada para a criação de anticorpos monoclonais (Carroll; Perkins, 1991). Tais fusões poderão ser conseguidas recorrendo a diversos métodos conhecidos da técnica (Harlow et al.), incluindo a exposição de uma mistura de células a polietilenoglicol e a exposição das células a um campo magnético forte (electrofusão). Os hibridomas são seleccionados por cultura num meio selectivo, sendo então testados quanto à sua especificidade relativamente ao antigénio, tal como abaixo se descreve.

Para a geração de anticorpos monoclonais contra os antigénios CD40 e B7, imunizaram-se ratinhos (Exemplo 5) com as células Sf9 que expressam estas moléculas à sua superfície celular. Uma semana após a segunda imunização, os ratinhos foram sangrados e os soros foram analisados quanto à presença de anticorpos específicos usando a coloração fluorescente de células aplicada a células

B transformadas por EBV (Exemplo 3). A Figura 5 apresenta os resultados da coloração celular, os quais indicam que os ratinhos imunizados com células Sf9 que expressam CD40 ou B7 evidenciavam um título sérico de anticorpos contra a linha ARC de células B transformadas por EBV (American Type Culture Collection (A.T.C.C.), 12301 Parklawn Dr., Rockville MD 20852), que é positivo tanto para CD40 como para B7. Por contraste, os ratinhos imunizados com células Sf9 de controlo não exibiram qualquer reactividade face às células ARC. Os resultados indicam que os animais hospedeiros podem ser imunizados com células Sf9 que expressam um antigénio associado a membrana seleccionado, e que a imunização resulta numa resposta imune que inclui anticorpos contra o antigénio recombinante. A imunização não resulta em anticorpos que exibam reactividade cruzada com outras proteínas humanas que não a proteína humana recombinante clonada nas células Sf9 de insecto.

Um dos ratinhos recebeu uma injeção final de reforço com células Sf9 expressando CD40 e outro recebeu uma injeção com células Sf9 expressando B7. Três dias após a injeção de reforço, os baços foram removidos e os esplenócitos foram fundidos com células SP2/0 de mieloma murino.

#### E. Isolamento e Imortalização de Linfócitos Produtores de Anticorpos Específicos

Os linfócitos seleccionados para a produção de anticorpos monoclonais serão preferencialmente linfócitos B, os quais poderão ser isolados a partir da medula óssea, baço ou nódulos linfáticos de um animal hospedeiro imune (Harlow et al.).

Alternativamente, os linfócitos B poderão ser isolados a partir da circulação periférica. Neste caso, as amostras de sangue são centrifugadas e submetidas a técnicas de separação em gradientes de modo a produzir uma mistura em bruto de linfócitos do sangue periférico (LSP). Os monócitos e linfócitos T são selectivamente retirados desta mistura celular de acordo com procedimentos estabelecidos (Mishell). As células remanescentes poderão ser submetidas a um procedimento de selecção, tal como um procedimento de “panning”, no qual as células que exibem afinidade para o antigénio são concentradas por captura selectiva por uma matriz de afinidade contendo o antigénio. No contexto do presente invento, uma tal matriz poderia incluir uma célula que expresse o antigénio associado a membrana.

Quando os linfócitos B são isolados a partir da circulação periférica tal como acima descrito, a transformação por um vírus transformante, tal como o vírus de Epstein-Barr, poderá revelar-se vantajosa. As células transformadas (linfoblastóides) são dispensadas para poços de subcultura e mantidas em cultura durante diversas semanas antes de as testar quanto à produção de anticorpos específicos. As culturas que evidenciem a produção destes anticorpos específicos são expandidas e fundidas com células de mieloma pertencentes a uma espécie apropriada recorrendo a um ou mais protocolos de fusão padronizados, incluindo o polietilenoglicol, como acima descrito, ou a electrofusão. Os métodos de isolamento e imortalização de linfócitos B a partir de diversas fontes são bem conhecidos da técnica.

Nas experiências efectuadas para suporte prático do presente invento, os esplenócitos de ratinhos imunizados foram fundidos com células Sp2/0 de mieloma murino usando polietilenoglicol, tal como previamente descrito por de Boer et al. (1988). Os clones de hibridoma foram processados tal como se descreve no Exemplo 6.

A Tabela 1 (Exemplo 6) apresenta um resumo dos dados das fusões. Após a fusão de CD40, apenas metade das células foi semeada em 480 poços. Tal resultou em 351 poços em que ocorreu o desenvolvimento do hibridoma. Após a fusão de B7, as células foram distribuídas por 960 poços e esta fusão forneceu 312 poços com desenvolvimento do hibridoma. Quatorze dias após as fusões, os sobrenadantes de 12 poços foram reunidos em pool e os pools foram testados quanto à presença de anticorpos reactivos face a células ARC. A análise FACS revelou que 4 pools provenientes da fusão de CD40 e 1 pool proveniente da fusão de B7 exibiam reactividade com as células ARC. Ao re-testar os sobrenadantes individuais provenientes dos pools positivos, foram identificados 4 poços reactivos com CD40 e 1 poço reactivo com B7. As células destes poços positivos foram clonadas por diluição limitante e, após 3 ciclos de crescimento celular, estabeleceram-se 4 clones estáveis de hibridoma anti-(CD40) (CD40-3A8, CD40-3C6, CD40-5D12 e CD40-5) e 1 clone estável de hibridoma anti-(B7) (B7-24). Estes resultados são indicativos da capacidade para conseguir clones estáveis de

hibridoma que segregam anticorpos monoclonais dirigidos contra um antígeno associado a membranas seleccionado.

Encontram-se disponíveis diversos métodos para o rastreio de fusões de hibridoma (Harlow et al.), incluindo: captura de anticorpos, usando (i) antígeno marcado, p.ex., antígeno purificado ou parcialmente purificado marcado radioactivamente, (ii) células íntegras ou permeabilizadas, p.ex., células Sf9 expressando o antígeno recombinante; e captura de antígenos, com (i) anticorpo/antígeno em solução, (ii) anticorpo/antígeno em fase sólida.

#### F. Teste da Especificidade dos Anticorpos Monoclonais

Foram usadas células transformadas por EBV para o rastreio dos sobrenadantes primários de hibridoma e para o rastreio dos produtos subsequentes da clonagem por diluição limitante. Diversas evidências abaixo expostas sugerem ter ocorrido a criação de 4 anticorpos monoclonais anti-(CD40) e 1 anticorpo monoclonal anti-(B7).

Em primeiro lugar, os sobrenadantes de todos os 5 clones de hibridoma reagiram com as células ARC e com outras linhas celulares B transformadas por EBV, mas não com as linhas de células T HSB (A.T.C.C.) e CEMM (A.T.C.C.).

Em segundo lugar, os ensaios de ligação competitiva foram efectuadas usando os anticorpos monoclonais do presente invento e as formas solúveis dos antígenos-alvo (Exemplo 7). Os sobrenadantes dos hibridomas foram pré-incubadas com as formas solúveis de CD40 e de B7 (Exemplo 7). Subsequentemente, as misturas foram adicionadas a células ARC para a execução da coloração fluorescente de células. Os resultados dos ensaios de competição encontram-se expostos na Figura 6. Os dados mostram que o antígeno B7 solúvel, mas não o CD40 solúvel, possuía a capacidade de bloquear a ligação do anticorpo monoclonal anti-(B7) B7-24 às células ARC. Por seu lado, o antígeno CD40 solúvel, mas não o B7 solúvel, exibia a capacidade de bloquear a ligação do anticorpo monoclonal anti-(CD40) CD40-3A8 às células ARC. Obtiveram-se resultados semelhantes para os outros 3 anticorpos monoclonais anti-(CD40). Adicionalmente, os efeitos do CD40 solúvel sobre os anticorpos monoclonais anti-(CD40) e do B7 solúvel sobre os anticorpos monoclonais anti-(B7) mostraram-se dependentes da concentração. A

redução da quantidade de proteína solúvel resultou na redução do bloqueio da ligação dos anticorpos às células ARC.

Num passo de análise posterior, os anticorpos monoclonais anti-(CD40) e anti-(B7) foram testados quanto à sua capacidade para se ligar às células B das amígdalas (Exemplo 8). A Tabela 2 mostra que 89-95% das células B isoladas de fresco das amígdalas apresentaram um teste de coloração positivo com os quatro anticorpos monoclonais anti-(CD40). Aproximadamente a mesma percentagem de células evidenciou positividade com o anticorpo monoclonal anti-(CD40) G28.5 (Clark et al.). A Tabela 3 mostra que 12-17 por cento das células B isoladas de fresco das amígdalas apresentaram um teste de coloração positivo com o anticorpo monoclonal anti-(B7) B7-24. No entanto, após cultura das células B das amígdalas durante 5 dias na presença de anticorpos anti-(IgM) imobilizados e de IL-2, a percentagem de células positivas para o B7-24 aumentou até cerca de 25 por cento.

Adicionalmente, quando as células B das amígdalas foram estimuladas com anticorpos anti-(IgM) e IL-2, não só aumentou o número de células B positivas para o anticorpo B7-24 como ainda se registou um aumento significativo da intensidade da coloração fluorescente por célula, indicando que a expressão de B7 aumentou após a estimulação.

Os dados acima indicam que o método do presente invento possibilita o isolamento de anticorpos monoclonais que reagem especificamente com os antigénios associados a membranas. Os anticorpos monoclonais obtidos pelo método do presente invento poderão ser tipados tal como anteriormente descrito (Harlow et al.).

#### G. Utilidade

Para a produção de anticorpos monoclonais, a situação óptima corresponde à imunização de ratinhos com material purificado. No entanto, a purificação de antigénios de membrana requer técnicas especializadas e complexas, e, ademais, a extracção a partir da membrana poderá alterar a estrutura da molécula. Adicionalmente, a solubilização das proteínas altera frequentemente a sua imunogenicidade. Deste modo, a maioria dos anticorpos monoclonais contra antigénios da superfície celular foi obtida após a imunização dos ratinhos com

células inteiras ou com fracções membranares. Em muitos casos, foram injectados subconjuntos específicos de linfócitos em ratinhos, resultando em painéis de anticorpos monoclonais. Estes anticorpos têm sido usados para isolar e caracterizar o antigénio ao qual se ligam. Quando os ratinhos são imunizados com células inteiras, são gerados anticorpos contra um grande número de moléculas diferentes. Deste modo, torna-se difícil utilizar as mesmas células para o rastreio da produção de anticorpos específicos por parte dos clones de hibridoma.

Com o objectivo de contornar o problema acima mencionado, o método do presente invento envolve a expressão de antigénios associados a membrana em células de insecto e o uso destas células de insecto para imunizar os animais hospedeiros. Desde a introdução da tecnologia de PCR (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988; Mullis; Mullis et al.), tornou-se relativamente simples a clonagem de cDNAs para proteínas relativamente às quais a sequência codificante de ácido nucleico foi já publicada. É possível usar primers de PCR abrangendo apenas a região codificante completa, e incorporar locais de restrição nestes primers para facilitar a sua clonagem em vectores de expressão.

Sabe-se já que as proteínas humanas intracelulares, secretadas e transmembranares podem ser expressas a níveis elevados em células de insecto quando expressas nestas células sob a regulação do gene não essencial de baculovírus para a proteína polihedrina (Webb et al., 1989; revisto por Luckow, 1990). As experiências realizadas para efeitos de suporte do presente invento demonstraram que apenas 2 injeções com  $5 \times 10^6$  células Sf9 expressando CD40 humano ou B7 humano proporcionaram bons títulos séricos contra estes antigénios. Ademais, as próprias células de insecto não provocaram uma reacção imunitária de reactividade cruzada com células humanas. Tal permitiu o uso de células B transformadas por EBV para o rastreio da produção de anticorpos específicos pelos clones de hibridoma, com um risco mínimo de obtenção de falsos positivos. Todos os poços primários positivos obtidos através do método do presente invento eram de facto específicos para o antigénio que foi usado para a imunização.

Os anticorpos obtidos através do método do presente invento, dirigidos contra antigénios associados a membrana, mostram-se vantajosos como agentes de diagnóstico para a detecção do antigénio associado a membrana. Como exemplo

encontram-se os anticorpos dirigidos contra proteínas marcadoras da superfície celular ou proteínas virais que emergem da superfície celular.

Uma das configurações de diagnóstico envolve o uso de anticorpos anti-virais que exibem a capacidade de detectar antígenos virais específicos. Os antígenos poderão ser detectados, por exemplo, usando um ensaio de captura de antígenos no qual os antígenos virais presentes em amostras de soro candidatas reagem com um anticorpo monoclonal ou policlonal específico para o antígeno. O anticorpo encontra-se ligado a um substrato sólido e o antígeno é então detectado por um segundo anticorpo marcado de modo diferente que se dirige contra o anticorpo anti-viral.

Os anticorpos anti-virais obtidos através do método do presente invento poderão ser usados como um meio para acentuar uma resposta imune anti-viral, uma vez que os complexos de anticorpo-vírus são tipicamente reconhecidos pelos macrófagos e por outras células efectoras. Os anticorpos poderão ser administrados em quantidades similares às usadas em outras administrações terapêuticas de anticorpos. Por exemplo, um pool de gama-globulina é administrado numa quantidade de 0,05-0,23 ml/kg de peso corporal durante a fase precoce da incubação de doenças virais, tais como a raiva, o sarampo e a hepatite B, com o objectivo de interferir com a entrada do vírus nas células. Assim, os anticorpos reactivos face a um antígeno viral associado a membrana poderão ser administrados de forma passiva isoladamente, ou num “cocktail” com outros anticorpos anti-virais, ou em conjugação com outro agente anti-viral para acentuar a resposta imune e/ou a eficácia de um fármaco anti-viral.

### III. Composições Utilizando Anticorpos

Este invento contempla o uso de anticorpos monoclonais tais como os produzidos através do método acima descrito. Os anticorpos do presente invento ligam-se a um antígeno CD40 humano à superfície de uma célula B humana e não estimulam o crescimento ou diferenciação da célula B. Estes anticorpos monoclonais poderão corresponder a anticorpos humanizados, a anticorpos de cadeia simples ou a fragmentos destes.

## A. Preparação dos Anticorpos

Os anticorpos monoclonais 5D12, 3A8 e 3C6 são preparados tal como se refere na secção II da descrição detalhada e nos Exemplos 1-7 aqui incluídos. Outros anticorpos monoclonais abrangidos pelo invento poderão ser preparados de modo similar, ou tal como se segue. Em primeiro lugar, são gerados anticorpos policlonais contra o antigénio CD40. Em segundo lugar, são seleccionados anticorpos monoclonais específicos para o CD40.

### 1. Soros Policlonais

Os soros policlonais poderão ser preparados por recurso a métodos convencionais. Em geral, é inicialmente usada uma solução contendo o antigénio CD40 ou o B7 para a imunização de um animal apropriado, preferencialmente um ratinho, rato, coelho ou cabra. Os coelhos e as cabras são preferidos para a preparação de soros policlonais devido ao volume de soro que é possível obter e à existência de anticorpos marcados anti-coelho e anti-cabra disponíveis. A imunização é geralmente efectuada através da mistura ou da emulsão da solução contendo o antigénio em soro fisiológico, preferencialmente num adjuvante tal como o adjuvante completo de Freund, e da injeção parentérica (geralmente subcutânea ou intramuscular) da mistura ou emulsão. Tipicamente, é suficiente uma dose de 50-200 µg/injeção. A imunização é geralmente reforçada 2-6 semanas depois com uma ou mais injeções da proteína em soro fisiológico, de preferência usando o adjuvante incompleto de Freund. Poder-se-ão alternativamente gerar anticorpos por imunização in vitro recorrendo a métodos bem conhecidos da técnica, procedimento esse que, para os fins do presente invento, é considerado equivalente à imunização in vivo.

Os antisoros policlonais são obtidos colhendo sangue do animal imunizado para um contentor de plástico ou de vidro, após o que o sangue é incubado a 25°C durante 1 hora, seguindo-se uma incubação a 4°C durante 2-18 horas. O soro é recuperado por centrifugação (p.ex., a 1000 x g durante 10 minutos). Poderão obter-se cerca de 20-50 ml por cada colheita efectuada em coelhos.

## 2. Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais são preparados utilizando o método de Kohler e Millstein, *Nature* (1975) 256:495-96, ou uma modificação do mesmo. Tipicamente, um ratinho ou rato é imunizado tal como acima se descreve. No entanto, em lugar de colher sangue ao animal para extrair o soro, é removido o baço (e opcionalmente diversos nódulos linfáticos grandes), fazendo-se a sua dissociação em células individualizadas. Se desejado, os esplenócitos poderão ser rastreados (após a remoção das células inespecificamente aderentes) aplicando uma suspensão de células numa placa ou poço revestido com a proteína antigénica. As células B expressando uma imunoglobulina ligada a membrana que seja específica para o antígeno ligam-se à placa, e não são removidas por lavagem juntamente com o resto da suspensão. As células B resultantes, ou todos os esplenócitos dissociados, são então induzidos a fundir-se com células de mieloma para formar hibridomas, e são cultivadas num meio selectivo (p.ex., hipoxantina, aminopterina, meio de timidina, "HAT"). Os hibridomas resultantes são plaqueados por diluição limitante e são ensaiados quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno imunizante de superfície celular desejado (e que não se ligam a antígenos não relacionados). Os hibridomas secretores de mAb seleccionados são então cultivados, *in vitro* (p.ex., em frascos de cultura de tecidos ou em reactores de fibras ocas) ou *in vivo* (como ascites em ratinhos).

Se desejado, os anticorpos (policlonais ou monoclonais) poderão ser marcados recorrendo a técnicas convencionais. Os marcadores adequados incluem fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (particularmente  $^{32}\text{P}$  e  $^{125}\text{I}$ ), reagentes densos a electrões, enzimas e ligandos possuindo parceiros de ligação específicos. Os enzimas são tipicamente detectados por meio da sua actividade. Por exemplo, a peroxidase de rábano é geralmente detectada através da sua capacidade para converter a 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) num pigmento azul, quantificável por um espectrofotómetro. O termo "parceiro de ligação específico" refere-se a uma proteína que tem a capacidade de se ligar com elevada especificidade a uma molécula de ligando, tal como, por exemplo, no caso de um antígeno e de um anticorpo monoclonal que lhe é específico. Outros parceiros de ligação específicos incluem a biotina e a avidina ou estreptavidina, IgG e proteína A, e os numerosos

pares de receptor-ligando conhecidos neste campo técnico. Deve entender-se que a descrição acima não pretende categorizar os diversos marcadores em classes distintas, uma vez que o mesmo marcador poderá encontrar utilidade por diversos modos distintos. Por exemplo, o  $^{125}\text{I}$  poderá funcionar como marcador radioactivo ou como reagente denso a electrões. A HRP poderá servir como enzima ou como antigénio para um mAb. Ainda, é possível combinar diversos marcadores para obter o efeito desejado. Por exemplo, os mAbs e a avidina requerem igualmente marcadores na prática deste invento; deste modo, poder-se-á marcar um mAb com biotina e detectar a sua presença com avidina marcada com  $^{125}\text{I}$ , ou com um mAb anti-biotina marcado com HRP. Outras permutações e possibilidades tornar-se-ão facilmente aparentes aos técnicos de perícia média, sendo consideradas como equivalentes no âmbito do presente invento.

#### IV. Epitopos do Antigénio CD40

Os epitopos do antigénio CD40 segundo este invento correspondem a moléculas que exibem imunoreactividade com anticorpos monoclonais anti-CD40 e cuja ligação a um antigénio CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana evita o crescimento ou a diferenciação da célula B. Ou seja, tais epitopos competem com a ligação dos ditos anticorpos ao antigénio CD40. As técnicas sistemáticas de identificação destes epitopos são já conhecidas da técnica, tal como descreve H.M. Geysen na patente norte-americana nº 4.708.871. Tipicamente, estes epitopos correspondem a curtas sequências de aminoácidos. Estas sequências poderão estar inseridas em sequências mais longas de péptidos ou proteínas, desde que se mantenham acessíveis.

Os epitopos do invento poderão ser preparados através de técnicas padronizadas de síntese de péptidos, tal como a síntese em fase sólida. Alternativamente, as sequências do invento poderão ser incorporadas em péptidos ou proteínas maiores através de métodos de recombinação. Tal é facilmente conseguido mediante a preparação de uma cassette de DNA que codifica para a sequência de interesse, e a ligação, no local apropriado, da cassette ao DNA que codifica para a proteína a modificar. O DNA da sequência poderá ser sintetizado

através de técnicas convencionais de síntese, ou poderá ser retirado do gene do fago pIII usando as enzimas de restrição apropriadas.

Os epitopos aqui identificados poderão ser preparados por meio de técnicas em fase sólida simples. A sequência mínima de ligação poderá ser determinada de forma sistemática para cada epitopo recorrendo a métodos convencionais; por exemplo, o método descrito por H.M. Geysen, Patente dos EUA nº 4.708.871. Abreviadamente, poder-se-á sintetizar um conjunto de oligopéptidos de regiões sobreponíveis derivados do antígeno CD40 e ligá-los a um conjunto de pins em fase sólida, encontrando-se um oligopéptido diferente em cada pin. Os pins são dispostos de modo a se ajustarem ao formato de uma placa de microtitulação de 96 poços, o que permite ensaiar todos os pins em simultâneo, p.ex., quanto à ligação a um anticorpo monoclonal anti-CD40. Usando este método, poder-se-á facilmente determinar a afinidade de ligação para todos os subconjuntos possíveis de aminoácidos consecutivos.

Poder-se-ão igualmente preparar análogos do invento recorrendo a métodos em fase sólida convencionais e aos métodos descritos no pedido de patente PCT US91/04282.

## VI. Formulações e Métodos de Administração

Os anticorpos e composições deste invento são administrados a uma concentração terapêuticamente eficaz para prevenir ou tratar doenças mediadas por anticorpos tal como alergias, LES, CBP e PTI. Para atingir este objectivo, os anticorpos ou composições poderão ser formulados usando diversos excipientes aceitáveis conhecidos da técnica. Tipicamente, os anticorpos ou composições são administrados por injeção intravenosa ou intraperitoneal. Os métodos para execução desta administração são conhecidos dos técnicos de perícia média. É igualmente possível obter composições que poderão ser administradas por via tópica ou oral, ou que possuem a capacidade de se difundir através de membranas mucosas.

Antes do passo de administração a pacientes, poderão adicionar-se agentes de formulação aos anticorpos. É preferida uma formulação líquida. Por exemplo, estes agentes de formulação poderão incluir óleos, polímeros, vitaminas, hidratos de

carbono, aminoácidos, sais, tampões, albumina, surfactantes ou excipientes. De preferência, os hidratos de carbono incluirão açúcares ou álcoois de açúcares tais como mono, di ou polissacáridos, ou glucanos solúveis em água. Os sacáridos ou glucanos poderão incluir frutose, dextrose, lactose, glucose, manose, sorbose, xilose, maltose, sacarose, dextrano, pululano, dextrina, alfa- e beta-ciclodextrina, amido solúvel, amido hidroxietílico e carboximetilcelulose, ou misturas destes. A sacarose é particularmente preferida. O termo “álcool de açúcar” designa um hidrato de carbono de C<sub>4</sub> a C<sub>8</sub> que possui um grupo –OH e inclui galactitol, inositol, manitol, xilitol, sorbitol, glicerol e arabitól. O manitol é particularmente preferido. Estes açúcares ou álcoois de açúcares acima mencionados poderão ser usados individualmente ou em combinação. Não existe um limite fixo para a quantidade usada, desde que o açúcar ou álcool de açúcar seja solúvel na preparação aquosa. De preferência, a concentração de açúcar ou álcool de açúcar encontrar-se-á entre 1,0 p/v % e 7,0 p/v %, mais preferencialmente entre 2,0 e 6,0 p/v %. De preferência, os aminoácidos incluem formas levóginas (L) de carnitina, arginina e betaína; no entanto, poderão ser adicionados outros aminoácidos. Os polímeros preferidos incluem a polivinilpirrolidona (PVP) com um peso molecular médio entre 2.000 e 3.000, ou polietilenoglicol (PEG) com um peso molecular médio entre 3.000 e 5.000. É igualmente preferido o uso de um tampão na composição, de modo a minimizar as alterações de pH na solução antes da liofilização ou após a reconstituição. Praticamente todos os tampões fisiológicos poderão ser utilizados, mas são preferidos os tampões de citrato, fosfato, succinato e glutamato ou misturas dos mesmos. O tampão de citrato é particularmente preferido. Preferencialmente, a concentração situa-se entre 0,01 e 0,3 molar. Os surfactantes que poderão ser adicionados à solução encontram-se expostos nas EP nos. 270.799 e 268.110.

Adicionalmente, os anticorpos poderão ser quimicamente modificados por conjugação covalente a um polímero de modo a aumentar a sua semi-vida em circulação, por exemplo. Os polímeros preferidos, e os métodos adequados para os ligar a péptidos, encontram-se expostos nas Patentes dos EUA nos. 4.766.106; 4.179.337; 4.495.285; e 4.609.546. Os polímeros preferidos são os polióis polioxetilados e o polietilenoglicol (PEG). O PEG é solúvel em água à temperatura ambiente e possui a fórmula geral: R(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-R, em que R pode

corresponder a hidrogénio ou a um grupo protector tal como um grupo alquilo ou alcanol. Preferencialmente, o grupo protector possui entre 1 e 8 carbonos, e mais preferencialmente corresponde a metilo. O símbolo n é um índice positivo, encontrando-se preferencialmente entre 1 e 1.000, mais preferencialmente entre 2 e 500. O PEG possui um peso molecular médio preferido de entre 1000 e 40.000, mais preferencialmente entre 2.000 e 20.000, e ainda mais preferencialmente entre 3.000 e 12.000. De preferência, o PEG possui pelo menos um grupo hidroxí, sendo mais preferencialmente um grupo hidroxí terminal. Será este hidroxí o grupo preferencialmente activado para reagir com um grupo amino livre pertencente ao inibidor. No entanto, dever-se-á ter em conta que o tipo e quantidade dos grupos reactivos poderá fazer-se variar tendo em vista o objectivo de obter a conjugação covalente de PEG/anticorpo segundo o presente invento.

Os polióis polioxietilados solúveis em água são igualmente de utilidade no presente invento. Estes incluem sorbitol polioxietilado, glicose polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), etc. O POG é preferido. Uma razão para esta preferência reside em que a estrutura primária de glicerol do glicerol polioxietilado corresponde à mesma estrutura que ocorre naturalmente em, por exemplo, animais e seres humanos nos mono-, di- e triglicéridos. Deste modo, a ramificação não seria necessariamente considerada como um agente estranho no organismo. O POG possui um peso molecular preferido numa gama correspondente à do PEG. A estrutura do POG é apresentada em Knauf et al., 1988, *J. Bio. Chem.* 263:15064-15070, e é encontrada uma exposição sobre os conjugados de POG/IL-2 na Patente dos EUA Nº. 4.766.106. Outro sistema de libertação de fármacos destinado a prolongar a semi-vida em circulação é o lipossoma. Os métodos para a preparação de sistemas de libertação baseados em lipossomas são expostos em Gabizon et al., *Cancer Research* (1982) 42:4734; Cafiso, *Biochem. Biophys. Acta* (1981) 649:129; e Szoka, *Ann. Rev. Biophys. Eng.* (1980) 9:467. Outros sistemas de libertação de fármacos bem conhecidos da técnica encontram-se descritos em, p.ex., Poznansky et al., *DRUG DELIVERY SYSTEMS* (R.L. Juliano, ed., Oxford, NY 1980), págs. 253-315; M.L. Poznansky, *Pharm. Revs.* (1984) 36:277.

Após a preparação da composição farmacêutica líquida, esta é preferencialmente liofilizada para prevenir a degradação e para preservar a

esterilidade. Os métodos para a liofilização de composições líquidas são bem conhecidos dos técnicos de perícia média neste campo. Imediatamente antes do uso, a composição poderá ser reconstituída com um diluente estéril (solução de Ringer, água destilada ou soro fisiológico estéril, por exemplo), o qual poderá conter alguns ingredientes adicionais. Após reconstituição, a composição é preferencialmente administrada a indivíduos através dos métodos conhecidos dos peritos na técnica.

Tal como acima se referiu, os anticorpos anti-CD40 e as composições do invento são usadas para tratar pacientes humanos com o objectivo de prevenir ou tratar doenças mediadas por anticorpos, tal como alergias, LES, CBP e PTI. A via de administração preferida para estes anticorpos é a parentérica. Na administração parentérica, as composições deste invento serão formuladas numa forma injectável de dosagem única tal como uma solução, suspensão ou emulsão, em associação com um veículo parentérico farmacologicamente aceitável. Tais veículos são inerentemente não tóxicos e não terapêuticos. Os exemplos de tais veículos incluem soro fisiológico, solução de Ringer, solução de dextrose e solução de Hanks. Poderão igualmente usar-se veículos não aquosos, tais como óleos fixos e oleato de etilo. Um veículo preferido corresponde a dextrose a 5% em soro fisiológico. O veículo poderá conter pequenas quantidades de aditivos, tais como substâncias que acentuam a isotonicidade e a estabilidade química, incluindo tampões e conservantes.

A dosagem e o modo de administração dependerão do indivíduo a ser tratado. Geralmente, as composições são administradas de modo a que a dose de anticorpos fornecida esteja entre 1 µg/kg e 20 mg/kg, mais preferencialmente entre 20 µg/kg e 10 mg/kg, e ainda mais preferencialmente entre 1 e 7 mg/kg. De preferência, a dose é administrada em bólus, de modo a aumentar em 10-20 vezes a concentração em circulação durante as 4-6 horas que se seguem à administração do bólus. Poderá ainda ser necessário recorrer a infusão contínua após a dose em bólus. Neste caso, poderá fazer-se uma infusão de anticorpos numa dose de entre 5 e 20 µg/kg/minuto, mais preferencialmente entre 7 e 15 µg/kg/minuto.

Os exemplos que se seguem ilustram, sem pretenderem limitar, o presente invento.

## Materiais e Métodos

O meio de Eagle da Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) e o soro fetal de bovino foram obtidos a partir da empresa JR Biosciences (Lenexa, KS); a penicilina e a estreptomicina foram fornecidos pela empresa Irvine (Santa Ana, CA); e o polietilenoglicol (p.m. 1500) foi fornecido pela Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

Meios de cultura. Cultivaram-se células de mieloma murino SP2/0, células de hibridoma, células T purificadas e células e linhas celulares B transformadas por EBV em IMDM suplementado com estreptomicina (200 µg/ml), penicilina (200 U/ml) e 10% de soro fetal de bovino inativado pelo calor (IMDM completo). As células de insecto Sf9 foram cultivadas sob agitação (125-150 rpm) em frascos contendo o meio descrito por Maiorella et al. (1989), suplementado com 0,5% de soro fetal de bovino. Cultivaram-se células 3T6-FcγRII em meio constituído por 50% de meio de Eagle modificado da Dulbecco e 50% de meio HAM-F10, suplementado por aminopterina (0,2 µg/ml), timidina (5 µg/ml), xantina (10 µg/ml), hipoxantina (15 µg/ml), ácido micofenólico (20 µg/ml), desoxicitidina (2,3 µg/ml), e 10% de soro fetal de bovino inativado pelo calor (DME/HAM-F10 completo). Cultivaram-se células 3T6-FcγRII/B7 em meio DME/HAM-F10 completo contendo 400 µg/ml de G418 (Gibco).

Células e linhas celulares. Isolaram-se células mononucleares do sangue periférico a partir de sangue heparinizado (obtido de voluntários saudáveis) recorrendo a centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque. As células T foram enriquecidas por remoção dos monócitos e das células B usando Lymphokwik (Lambda, California) (1 X). A linha celular ARC de células B transformadas por EBV e a linha celular P815, uma linha celular de mastocitoma murino NK-resistente que expressa FcγRII e FcγRIII (Ra, C. et al., Nature (1989) **341**:752), foram obtidas do ATCC (Rockville, MD). A linha celular 3T6-FcγRII de fibroblastos de ratinho expressando CD32, o alelo altamente responsivo de FcγRII humano, tal como descrito por Warmerdam, P.A.M. et al., J. Exp. Med. (1990) **172**:19, foi graciosamente cedido pelo Dr. J. van de Winkel (Hospital Universitário de Utrecht, Holanda). O subclone mutante EL4B5 de timoma de ratinho EL-4 foi cedido pelo Dr. R.H. Zubler, Hôpital Cantonal Universitaire, Genebra. As células transfectantes 3T6 de ratinho expressando moléculas híbridas da forma alélica HR (altamente

responsiva) do Fc $\gamma$ RIIa humano foram oferecidas pelo Dr. P.A.M. Warmerdam, Departamento de Imunologia Experimental, Hospital Universitário de Utrecht, Holanda. Warmerdam et al., J. Immunol. (1991) 147:1338. Ambas as linhas celulares foram cultivadas em Meio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM), suplementado com gentamicina (80  $\mu$ g/ml) e 10% de soro fetal de bovino inativado pelo calor (FCS) (Hyclone, Logan, Utah). Para evitar a possível perda da capacidade de activação das células B, descongelou-se um novo lote de células EL4B5 todas as 4-8 semanas. As linhas celulares foram periodicamente testadas quanto à contaminação por Mycoplasma através do uso de uma sonda de DNA marcado com  $^3$ H dirigida ao RNA ribossomal de Mycoplasma (GenProbe, San Diego, CA), tendo-se evidenciado como isentas de Mycoplasma ao longo do período em que decorreram os ensaios.

Linfócitos B Humanos. Isolaram-se linfócitos B das amígdalas obtidas de crianças submetidas a amigdalectomias, essencialmente como descrito em DeGroot et al., Lymphokine Research (1990) 9:321. Abreviadamente, o tecido foi disperso usando lâminas de bisturi, as células fagocitárias e as células NK foram removidas por tratamento com éster metílico de L-leucina 5 mM e as células T foram removidas por meio de um ciclo de ensaio de rosetas com eritrócitos de carneiro (SRBC) tratados com brometo de 2-aminoetilisotiourónio. A pureza das preparações de linfócitos B resultantes foi avaliada por marcação imunofluorescente indirecta com mAb anti-(CD20) B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) ou mAb anti-(CD3) OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) e com um fragmento F(ab')<sub>2</sub>, conjugado com FITC, de Ac de coelho anti-(Ig de ratinho) (Zymed, San Francisco, CA), procedendo-se a uma análise por FACS. As preparações de células B continham (média  $\pm$  SD de 6 isolamentos): 95  $\pm$  4% de células CD20-positivas e 2  $\pm$  1% de células CD3-positivas.

Anticorpos. O anticorpo monoclonal anti-(B7 humano) BB-1 (Yokochi et al., 1982), fornecido pelo Dr. E.A. Clark (Universidade de Washington, Seattle, WA), foi usado sob a forma de anticorpo purificado. O anticorpo monoclonal anti-(CD40 humano) G27.5 (Clark et al., 1986) foi oferecido pelo Dr. J.A. Leadbetter (Oncogen Corporation, Seattle, WA) e foi usado como anticorpo purificado. O anticorpo monoclonal anti-(CD40) S2C6 (Paulie et al., 1985) foi fornecido pelo Dr. S. Paulie (Universidade de Estocolmo, Suécia) e foi usado como anticorpo purificado. Os

anticorpos monoclonais anti-(CD26 humano) Ta-1 e anti-(CD20) B1 foram fornecidos pela Coulter (Hialeah, FL). O anticorpo monoclonal anti-(CD3) OKT3 foi fornecido pela Ortho (Raritan, NJ), e o anticorpo monoclonal anti-(LeuM3) foi fornecido pela Becton-Dickinson (San Jose, CA). Os anticorpos anti-(IgM) acoplados a esferas (Immunobeads) foram fornecidos pela Bio-Rad (Richmond, CA).

O mAb anti-B7 B7-24 (IgG2a, x), e os mAbs anti-CD40 5D12, 3C6 e 3A8 foram obtidos tal como descrito na Secção II, acima, e usados como anticorpos purificados. O mAb anti-CD3 CLB-T3/4.1 (IgG1, x) foi usado sob a forma de sobrenadante diluído de cultura de tecidos e foi graciosamente cedido pelo Dr. L. Aarden (Laboratório Central do Serviço de Transfusão de Sangue da Cruz Vermelha, Amsterdão, Holanda). O mAb anti-CD3 UCHT1 (IgG, x) foi usado como anticorpo purificado e por oferta do Dr. P. Beverley (Imperial Research Cancer Fund, Londres, RU). O mAb anti-CD72 WL225 (IgG2a, x) foi usado como anticorpo purificado por oferta do Dr. K. Thielemans (Vrije Universiteit, Bruxelas, Bélgica). O mAb anti-ICAM-1 84H10 foi usado sob a forma de fluido de ascite diluído. O mAb anti-CD40 S2C6 foi uma oferta do Dr. S. Paulie (Universidade de Estocolmo, Suécia). Paulie et al., J. Immunol. (1989) 142:590. O mAb anti-CD40 G28.5 foi oferecido pelo Dr. J.A. Leadbetter (Oncogen Corporation, Seattle, WA, EUA). Clark et al., PNAS (USA) (1986) 83:4494. Os anticorpos de controlo foram: o mAb anti-( $\beta$ -glucocerebrosidase) 8E4 (IgG1), Barneveld et al., Eur. J. Biochem. (1983) 134:585, e as imunoglobulinas de mieloma MOPC-21 (IgG1) e MOPC-141 (IgG2b) (Sigma, St. Louis, MO). Todos os mAbs foram usados como preparações de anticorpos purificados. A proteína de fusão hCD40.H $\mu$  foi uma oferta do Dr. P. Lane (Instituto de Imunologia de Basileia, Basileia, Suíça) e foi usada como um sobrenadante 5 x concentrado de células J558L transfectadas. Lane et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22:2573.

Os anticorpos monoclonais do presente invento poderão ser marcados, através de métodos convencionais, usando diversas moléculas-repórter, incluindo as seguintes: marcadores fluorescentes (fluoresceína (FITC), R-ficoeritrina, rodamina (TMRITC), rodamina 600 (XRITC), "Texas Red" e semelhantes, vulgarmente ligados à avidina); porções moleculares radioactivas ( $^{125}\text{I}$  e semelhantes); moléculas emissoras de luz (luciferase e semelhantes); enzimas (peroxidase de rábano,

fosfatase alcalina, glucose oxidase,  $\beta$ -galactosidase e semelhantes). Adicionalmente, os anticorpos repórter (anticorpos que exibem especificidade de ligação para os anticorpos monoclonais do presente invento, p.ex., IgG de cabra anti-ratinho) poderão igualmente utilizar as moléculas marcadoras acima listadas.

Enzimas e Oligonucleótidos. A DNA polimerase I de *E. coli* (fragmento de Klenow) foi fornecida pela Boehringer Mannheim Biochemicals (BMB) (Indianapolis, IN). A DNA ligase de T4 e a DNA polimerase de T4 foram obtidas a partir da empresa New England Biolabs (Beverly, MA). Os filtros de nitrocelulose foram fornecidos pela empresa Schleicher and Schuell (Keene, NH). Os linkers oligonucleotídicos sintéticos e os primers foram preparados usando sintetizadores automatizados de oligonucleótidos comercialmente disponíveis. Alternativamente, poderão adquirir-se oligonucleótidos sintéticos customizados, por exemplo, à empresa Synthetic Genetics (San Diego, CA). O kit para síntese de cDNA e os kits para marcação de primers arbitrários são obtidos da empresa Boehringer Mannheim Biochemicals (BMB, Indianapolis, IN). As sequências oligonucleotídicas codificando para péptidos poderão ser obtidas por síntese, tal como acima descrito. Alternativamente, os péptidos poderão ser sintetizados directamente usando técnicas in vitro padronizadas (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As manipulações comuns envolvidas no trabalho com anticorpos policlonais e monoclonais, incluindo a purificação de anticorpos, foram efectuadas recorrendo a procedimentos padronizados (Harlow et al.).

Ensaio de Coloração Fluorescente de Células (FACS). As células ( $10^6$ /amostra) são incubadas com 10  $\mu$ l de anticorpo primário (10  $\mu$ l/ml em PBS-BSA ou HBSS (Solução Salina Equilibrada de Hanks, Gibco/BRL) suplementado com 1% de BSA e 0,05% de azida de sódio) durante 20 minutos a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA, as células foram incubadas em 100  $\mu$ l de fragmentos  $F_{ab'2}$  marcados por FITC de anticorpos de cabra anti-(IgG de ratinho) (Jackson, West Grove, PA) durante 20 minutos a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA e uma lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS. As análises foram efectuadas no equipamento FACSSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, CA).

### Ensaio de Proliferação de Células T Mediada por B7

Cultivaram-se células T purificadas com fibroblastos 3T6 transfectados com o alelo altamente responsivo de FcγRIIa e com a molécula de B7 (de Boer, M. et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22:3071-3075). A proliferação foi medida através da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. Abreviadamente,  $4 \times 10^4$  células T foram cultivadas com  $10^4$  células 3T6-FcγRII/B7 irradiadas (2500 rads) em placas de cultura de tecidos com 96 poços de fundo plano, com 200 μl de IMDM completo por poço e com ou sem mAb anti-CD3 CLB-T3/4.1. Durante as últimas 16 horas de um período de cultura de 72 horas, as células foram pulsadas com <sup>3</sup>H-timidina a 1 μCi/poço. A proliferação das células T é expressa como a média de cpm por conjunto de três poços.

Ensaio de Células T Citotóxicas. Cultivaram-se células T purificadas com fibroblastos 3T6 transfectados com o alelo altamente responsivo de FcγRIIa e com a molécula de B7. Abreviadamente,  $10^6$  células T foram cultivadas com  $0,2 \times 10^6$  células 3T6-FcγRII/B7 irradiadas (2500 rads) em placas de cultura de tecidos com 24 poços de fundo plano, com 1 ml de IMDM completo por poço e na presença de mAb anti-CD3 UCHT1, durante 3-4 dias. A actividade citotóxica dos linfócitos foi analisada num ensaio de citotoxicidade anti-CD3-redireccionado, tal como abaixo se descreve.

### Ensaio de Cultura Mista de Linfócitos (MLC)

A proliferação de células T purificadas foi medida em culturas mistas de linfócitos (MLC) usando a linha celular ARC de células B transformadas por EBV como células estimuladoras. Cultivaram-se  $5 \times 10^4$  células T com  $5 \times 10^4$  células estimuladoras irradiadas (5000 rads) em placas de cultura de tecidos com 96 poços de fundo redondo (Corning) com 200 μl de meio IMDM completo por poço. Durante as últimas 16 horas de um período de cultura de 72 horas, as células foram pulsadas com <sup>3</sup>H-timidina a 1 μCi/poço. A proliferação das células T é expressa como a média de cpm por conjunto de três poços. Para os MLCs secundários, as células foram estimuladas tal como acima se descreveu para o MLC primário. Os blastos de células T para o MLC secundário foram gerados ao longo de 5-7 dias no MLC primário, com cultura subsequente na ausência de células estimuladoras durante 2-4 dias. A actividade citotóxica das células T geradas no MLC primário ou secundário

foi analisada num ensaio de citotoxicidade anti-CD3-redireccionado usando as células P815 de ratinho, tal como abaixo se descreve. Alternativamente, as células B transformadas por EBV usadas para induzir a actividade CTL serviram como células-alvo.

Ensaio de Citotoxicidade. A actividade de CTL foi determinada num ensaio de lise de células-alvo com a duração de 4 horas, usando como alvo células P815 de mastocitoma murino ou células B ARC transformadas por EBV. No caso das células-alvo P815, as CTLs foram dirigidas não especificamente para as células-alvo usando o mAb anti-CD3 OKT3 a uma concentração de 2 µg/ml. Quando são utilizadas células ARC como células-alvo, apenas as CTLs aloantígeno-específicas participam no processo de lise. Incubaram-se  $10^6$  células-alvo com 200 µCi de  $^{51}\text{Cr}$ -cromato de sódio (Amersham International) durante uma hora, seguindo-se uma lavagem. Os ensaios de CTL foram efectuados em placas de microtitulação com 96 poços de fundo em V usando 5000 células-alvo marcadas com  $^{51}\text{Cr}$  com diversas quantidades de células efectoras num volume total de 200 µl/poço. Encheram-se quatro poços com  $5 \times 10^3$  células-alvo em 200 µl de meio apenas, e quatro poços com  $5 \times 10^3$  células-alvo em 100 µl de meio e 100 µl de saponina (para avaliação da libertação espontânea e da libertação máxima, respectivamente). No caso das células P815, encheram-se três poços com células efectoras e células-alvo na ausência de mAb anti-CD3 (para determinar a lise experimental de fundo). Outros três poços continham igualmente o mAb anti-CD3 a 2 µg/ml de modo a se determinar a lise total na presença de anti-CD3. As placas foram centrifugadas durante 10 minutos a  $200 \times g$  e incubadas durante quatro horas a  $37^\circ\text{C}$ . Seguidamente, procedeu-se à contagem de 100 µl do sobrenadante de cada poço num contador gama. Os resultados foram expressos sob a forma de percentagem de libertação específica dependente de anti-CD3 com as células-alvo P815, ou de percentagem de libertação aloantígeno-específica com as células-alvo ARC.

Ensaio de Proliferação de Células B. Cultivaram-se células B ( $4 \times 10^4$  por poço) em 200 µl de IMDM suplementado com 10% de soro fetal de bovino em placas de microtitulação de 96 poços de fundo plano. As células B foram estimuladas pela adição de anticorpos anti-(IgM) imobilizados (Immunobeads; 5 µg/ml; Bio-Rad, Richmond, CA). Quando indicado, adicionou-se 100 U/ml de IL-2 recombinante.

Adicionaram-se diversas concentrações de mAbs no início das microculturas e a proliferação foi avaliada ao dia 3 por medição da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina após um período de pulsos que se prolongou por 18 horas.

#### Ensaio de Proliferação de Células B Semelhante ao Ensaio de Banchereau

Para testar a capacidade exibida pelos mAbs anti-CD40 para estimular a proliferação de células B num sistema de cultura semelhante ao descrito por Banchereau et al., Science (1989) 251:70, usaram-se células transfectantes 3T6 de ratinho expressando a forma alélica HR do FcγRII humano. Cultivaram-se células B ( $2 \times 10^4$  células por poço) em microplacas com poços de fundo plano na presença de  $1 \times 10^4$  células transfectantes (irradiadas com 5000 rads) em 200 µl de IMDM suplementado com 10% de soro fetal de bovino e 100 U/ml de IL-4 recombinante. Antes da adição das células B, deixaram-se as células 3T6 a aderir ao plástico do poço de cultura durante pelo menos 5 horas. Adicionaram-se mAbs anti-CD40 a concentrações variando entre 15 ng/ml e 2000 ng/ml, e a proliferação das células B foi avaliada ao dia 7 por medição da incorporação de timidina, após um período de pulsos com [<sup>3</sup>H]-timidina com a duração de 18 horas.

Ensaio de Activação de Células B com Células EL4B5. Cultivaram-se as células B (1000 por poço) juntamente com células EL4B5 ( $5 \times 10^4$  por poço) irradiadas (5000 rad) em microplacas com poços de fundo plano com 200 µl de IMDM suplementado com 10% de soro fetal de bovino inactivado pelo calor, 5 ng/ml de 13-acetato de forbol-12-miristato (Sigma) e 5% de sobrenadante de células T humanas. Adicionaram-se mAbs a concentrações variáveis no início da cultura, e a incorporação de timidina foi avaliada ao dia 6 após um período de 18 horas de pulsos com [<sup>3</sup>H]-timidina. Para a preparação do sobrenadante de células T, foram cultivadas durante 36 horas células T purificadas, a uma densidade de  $10^6$ /ml, na presença de 1 µg/ml de PHA e de 10 ng/ml de PMA. Wen et al., supra. O sobrenadante das células T foi obtido por centrifugação das células e foi armazenado a -20°C. Foi testada a eficácia dos sobrenadantes de células T na intensificação da proliferação das células B humanas em culturas de células EL4B5, e os sobrenadantes mais eficazes foram reunidos num pool e usados nos ensaios.

### Ensaio com Células T Helper Humanas para Anticorpos

Produção pelas Células B. Revestiram-se placas de cultura de tecidos de 96 poços com uma diluição a 1:500 de fluido de ascite do mAb anti-CD3 CLB-T3/3 (CLB, Amsterdão, Holanda). Conforme indicado, foram adicionados mAbs co-estimuladores: os mAbs anti-CD2 CLB-T11.1/1 e CLB-T11.2/1 (CLB, Amsterdão, Holanda), ambos de ascites em diluição 1:1000, e o mAb anti-CD28 CLB-28/1 (CLB, Amsterdão, Holanda). Subsequentemente, adicionaram-se células T das amígdalas (irradiadas, 3000 rad;  $10^5$  por poço), células B das amígdalas ( $10^4$  por poço) e rIL-2 (20 U/ml). O volume final de cada cultura de células correspondeu a 200  $\mu$ l. Após 8 dias, as células foram submetidas a centrifugação e foi recolhido o sobrenadante livre de células. As concentrações de IgM e IgG humana nas amostras (diluídas) foram avaliadas por ELISA, tal como abaixo se descreve.

### Ensaio de ELISA para a Quantificação de Imunoglobulinas

As concentrações de IgG e de IgM foram avaliadas por ELISA. Revestiram-se placas de ELISA de 96 poços com 4  $\mu$ g/ml de mAb de ratinho anti-IgG humana MH 16-01 (CLB, Amsterdão, Holanda) ou com 1,2  $\mu$ g/ml de mAb de ratinho anti-IgM humana 4102 (Tago, Burlingame, CA) em tampão de carbonato 0,05 M (pH = 9,6), por incubação durante 16 h a 4°C. As placas foram lavadas por 3 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 1 h a 37°C com diferentes diluições das amostras em teste. Após 3 lavagens, a Ig ligada foi detectada por incubação durante 1 hora a 37°C com 1  $\mu$ g/ml de mAb de ratinho anti-IgG humana MH 16-01 marcado com peroxidase (CLB) ou mAb de ratinho anti-IgM humana MH 15-01 marcado por peroxidase (CLB). As placas foram lavadas por 4 vezes e a actividade da peroxidase ligada foi revelada pela adição de O-fenilenodiamina como substrato. Foi usado soro humano padrão (H00, CLB) para estabelecer uma curva-padrão para cada ensaio.

Ensaio de Citofluorometria de Fluxo. Incubaram-se células ARC ( $10^6$  células/amostra) em 100  $\mu$ l de anticorpo primário (10  $\mu$ g/ml em PBS-BSA ou solução salina equilibrada de Hanks (HBSS) suplementada com 1% de BSA e 0,05% de

azida de sódio) durante 20 minutos a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA, as células foram incubadas com 100 µl de fragmentos F<sub>ab</sub>'<sub>2</sub> marcados por FITC de anticorpos de cabra anti-(IgG de ratinho) (Jackson, West Grove, PA) durante 20 minutos a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA e uma lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS. As análises foram efectuadas no equipamento FACSSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Alternativamente, foram recolhidas células EL4B5 antes, e - a diferentes pontos de tempo - durante a cultura em meio contendo PMA (5 ng/ml) e sobrenadante de células T humanas (5%). As células foram incubadas durante 30 minutos com 10 µl de sobrenadante de células transfectadas contendo hCD40-Hµ diluída em 100 µl de Solução Salina Equilibrada de Hanks suplementada com 0,05% de azida de sódio (4°C). Seguidamente procedeu-se à incubação com fragmentos F<sub>ab</sub>'<sub>2</sub> marcados por FITC de anticorpos de coelho anti-(IgM de ratinho) (Laboratório Central do Serviço de Transfusão de Sangue, Amsterdão, Holanda). Como controlo, usaram-se células incubadas apenas com o conjugado de FITC. As análises foram efectuadas num citofluorómetro FACScan-4 (Becton-Dickinson). As células não vitais foram excluídas da análise por recurso a iodeto de propídio.

### Exemplo 1

#### Clonagem por PCR do CD40

Isolou-se RNA de uma população de esplenócitos humanos transformados por EBV, essencialmente como descrito por Chirgwin et al. (1979). Abreviadamente, as células foram lavadas por duas vezes com soro fisiológico tamponado por fosfato (PBS) e lisadas em tiocianato de guanidínio 5 M na presença de 2-mercaptoetanol 0,7 M. O lisado de células foi separado em camadas num gradiente descontínuo de CsCl (Chirgwin et al.) e centrifugado durante 16 horas a 26.000 rpm num rotor Beckman SW28. O RNA foi recuperado através da dissolução do pellet em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC. O RNA foi precipitado por etanol por uma vez, ressuspensão em H<sub>2</sub>O tratada com DEPC e armazenado a -70°C.

O RNA total (10 µg/reacção) foi convertido em cDNA usando a técnica de priming com hexâmeros arbitrários em 50 µl de tampão de reacção contendo 500

unidades de LMV-RT (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD), 5  $\mu$ M de hexâmeros arbitrários (Pharmacia, Piscataway, NJ), DTT 1 mM, mistura de dNTPs (0,5 mM cada), Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, e 0,1 mg/ml de BSA (albumina sérica bovina). Após incubação a 37°C durante 1 hora, as amostras foram levadas a ebulição durante 3 min e armazenadas a -70°C. O DNA codificando para CD40 foi gerado por PCR por recurso a primers contendo sequências que exibem homologia com a sequência conhecida do CD40, codificando igualmente estes primers para locais de restrição úteis para a clonagem (Figura 2). Estes primers tiveram por base as sequências codificantes de cDNA publicadas para o CD40 (Stamenkovic et al., 1989). Todos os primers começam por um gancho C-G na extremidade 5', seguido de um local de restrição para clonagem (apresentado em negrito, Figura 2). As sequências sublinhadas nos primers reversos, para a clonagem da forma solúvel do CD40, representam um epitopo reconhecido por um anticorpo monoclonal que é usado para a purificação por afinidade. Os números entre parênteses representam a localização dos primers relativamente ao cDNA publicado para o CD40.

Para a amplificação por PCR, 1  $\mu$ l de cDNA foi misturado com 1  $\mu$ l (10 picomoles) de um primer directo, 1  $\mu$ l (10 picomoles) de um primer reverso, e 47  $\mu$ l de uma mistura de PCR. A mistura de PCR consistiu em 1,25 unidades de Taq polimerase (Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT), mistura de dNTPs (0,2 mM cada), Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, e 0,1 mg/ml de BSA. Os 50  $\mu$ l da mistura de PCR foram cobertos com 70  $\mu$ l de óleo mineral e submetidos a 25 ciclos de amplificação num termociclador Perkin-Elmer/Cetus (desnaturação a 95°C durante 30 seg, annealing do primer a 55°C durante 30 seg e extensão a 72°C durante 1,5 min). Os produtos de PCR foram obtidos após 25 ciclos de amplificação.

Os produtos da amplificação foram digeridos com *Bgl*III e *Kpn*I (Figura 1B) e isoladas por fraccionamento por dimensões. Antes da sua expressão em baculovírus, a sequência de DNA de cada fragmento foi confirmada por análise de sequenciação para evitar a introdução de mutações induzidas por PCR. O vector de transferência de baculovírus pAcC8 foi igualmente digerido com *Bgl*III e *Kpn*I (Figura 1B).

Os fragmentos amplificados foram ligados ao vector linearizado pAcC8 (a razão entre a inserção e o vector correspondeu a 3:1). Os produtos de ligação foram transformados usando a estirpe bacteriana DH5 $\alpha$  (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) e os vectores pAcC8 recombinantes foram seleccionados com base na resistência à ampicilina. Os plasmídeos recombinantes foram isolados a partir dos clones bacterianos (Maniatis et al.; Ausubel et al.), e a presença da inserção de interesse foi verificada por meio de reacções em cadeia por polimerase (ver acima). A preparação de plasmídeo em grande escala foi efectuada seguindo procedimentos padronizados (Ausubel et al.; Maniatis et al.; Sambrook et al.).

## Exemplo 2

### Expressão em Baculovírus do CD40 Humano

As sequências codificando para CD40 humano e B7 humano foram recombinadas no baculovírus de *Autographa californica* (AcNPV) usando os vectores de transferência pAcCD40 (codificando para a molécula de CD40 de extensão completa) e pAcCD40-ED/Glu (codificando para o domínio extracelular de CD40).

Os plasmídeos foram co-transfectados com DNA de baculovírus de tipo selvagem (2-10 pfu) (AcNPV; Summers et al.) em células Sf9 (de *Spodoptera frugiperda*) numa densidade de 10<sup>6</sup> células/ml (Summers et al.). As células Sf9 infectadas com baculovírus recombinante foram identificadas e os seus clones foram purificados (Summers et al.).

Para a expressão à superfície celular de proteínas recombinantes, as células foram recolhidas após 48 horas de cultura; para a produção das proteínas recombinantes secretadas, as células foram recolhidas após 72 horas de cultura.

## Exemplo 3

### ELISA em Células Sf9

As células de insecto Sf9 infectadas com vírus recombinante foram cultivadas durante 48 horas em placas de 24 poços. Após a remoção do meio de cultura de

tecidos, as placas foram incubadas durante 45 min à temperatura ambiente (TA) com 0,25 ml de anticorpo em PBS com 1% de BSA (PBS-BSA). Após três lavagens com PBS-BSA, as placas foram incubadas durante 35 min à TA com 250 µl de uma diluição 1/250 de imunoglobulinas de cabra anti-(Ig total de ratinho) conjugadas com peroxidase de rábano (Zymed, South San Francisco, CA) em PBS-BSA. A actividade da peroxidase não ligada foi removida por cinco lavagens com PBS-BSA. A actividade da peroxidase ligada foi revelada pela adição de uma mistura de reacção preparada por diluição de 0,5 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina a 2 mg/ml em etanol até 10 ml com acetato de Na 10 mM, tampão de EDTA 10 mM (pH 5,0) e por adição de 0,03% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reacção foi interrompida após 10 min por adição de 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

Os ensaios de ELISA acima descritos efectuados em células Sf9 vivas forneceram os resultados que se seguem. A Figura 3 apresenta os dados obtidos com células Sf9 vivas infectadas com pAcB7 e com pAcCD40, as quais foram cultivadas durante 48 horas em placas de 24 poços. Os anticorpos usados no ensaio de ELISA foram: S2C6, anti-(CD40) (barras abertas) e anticorpo primário ausente (barras a tracejado).

#### Exemplo 4

#### Coloração Fluorescente de Células

##### A. Coloração Fluorescente de Células

As células (10<sub>6</sub>/amostra) foram incubadas com 10 µl de anticorpo primário (10 µg/ml em PBS-BSA ou HBSS (Solução Salina Equilibrada de Hanks, Gibco/BRL) suplementado com 1% de BSA e 0,05% de azida de sódio) durante 20 min a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA, as células foram incubadas com 100 µl de fragmentos F<sub>ab</sub>2 marcados por FITC de anticorpos de cabra anti-(IgG de ratinho) (Jackson, West Grove, PA) durante 20 minutos a 4°C. Após 3 lavagens com PBS-BSA ou HBSS-BSA e uma lavagem com PBS, as células foram ressuspensas em 0,5 ml de PBS. As análises foram efectuadas num equipamento FACSSCAN V (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Os protocolos gerais para a análise por citometria de fluxo e a análise dos dados clínicos relativos à citometria de fluxo foram apresentados em detalhe em Keren et al. e em Coon et al. As técnicas gerais de contagem de células sanguíneas e a quantificação do DNA foram descritas por Powers, Keren et al. e por Coon et al.

Os dados da coloração fluorescente das células B ARC transformadas por EBV são apresentados na Figura 5. Na Figura 5A são apresentados os resultados da coloração obtidos com uma diluição 1:100 de soro de um ratinho imunizado com células Sf9 expressando B7 (linha contínua) ou uma diluição 1:100 de soro normal de ratinho (linha pontuada).

A Figura 5B apresenta os resultados da coloração obtidos com uma diluição 1:100 de soro de um ratinho imunizado com células Sf9 expressando CD40 (linha contínua) ou uma diluição 1:100 de soro normal de ratinho (linha pontuada).

A Figura 5C apresenta os resultados da coloração obtidos com uma diluição 1:100 de soro de um ratinho imunizado com células Sf9 de controlo (linha contínua) ou uma diluição 1:100 de soro normal de ratinho (linha pontuada).

#### B. Ensaios de Competição com Antígeno Solúvel

Efectuou-se a coloração de células B ARC transformadas por EBV com anticorpos monoclonais anti-(B7) e anti-(CD40) na presença e na ausência de B7 solúvel e de CD40 solúvel. Os anticorpos e o B7 solúvel, o CD40 solúvel ou os controlos foram pré-incubados à TA durante 20 min antes da sua adição às células ARC.

A Figura 6A mostra os resultados da coloração com B7-24 (linha pontuada) ou com anticorpo secundário apenas (linha contínua). A Figura 6B apresenta os resultados da coloração com B7-24 apenas (linha pontuada) ou com B7-24 pré-incubado com B7 solúvel (linha contínua). A Figura 6C apresenta os resultados da coloração com B7-24 apenas (linha pontuada) ou com B7-24 pré-incubado com CD40 solúvel. A Figura 6D mostra os resultados da coloração com CD40-3A8 (linha pontuada) ou com anticorpo secundário apenas (linha contínua). A Figura 6E apresenta os resultados da coloração com CD40-3A8 apenas (linha pontuada) ou com CD40-3A8 pré-incubado com B7 solúvel (linha contínua). A Figura 6F apresenta

os resultados da coloração com CD40-3A8 apenas (linha ponteadada) ou com CD40-3A8 pré-incubado com CD40 solúvel (linha contínua).

#### Exemplo 5

##### Imunização do Animal Hospedeiro

Injectaram-se intraperitonealmente ratinhos BALB/c fêmea ao dia 0 e ao dia 14 com  $5 \times 10^6$  células Sf9 infectadas com vírus AcCD40, vírus AcB7 ou vírus AcCd3 (vírus de controlo). Ao dia 21, obtiveram-se 100 µl de soro para teste quanto à presença de anticorpos específicos. Após um período de repouso de pelo menos duas semanas, os ratinhos receberam uma injeção final com  $5 \times 10^6$  células infectadas com vírus AcCD40 ou com vírus AcB7. Três dias após esta injeção final, os esplenócitos foram usados para a fusão celular.

#### Exemplo 6

##### Criação de Clones de Hibridoma

Os esplenócitos de ratinhos BALB/c imunizados foram fundidos com células de mieloma murino SP2/0 a uma razão de 10:1 usando polietilenoglicol a 50%, tal como previamente descrito por de Boer et al. (1988). As células fundidas foram ressuspensas em meio IMDM completo suplementado com hipoxantina (0,1 mM), aminopterinina (0,01 mM), timidina (0,016 mM) e 0,5 ng/ml de hIL-6 (Genzyme, Cambridge, MA). As células fundidas foram então distribuídas entre os poços de placas de cultura de tecidos com 96 poços, de modo a que cada poço contivesse em média um híbrido em crescimento.

Após 10-14 dias, os sobrenadantes das populações de hibridoma foram rastreados quanto à produção de anticorpos específicos. Para o rastreio da produção de anticorpos específicos pelos clones de hibridoma, os sobrenadantes de 12 poços foram reunidos num pool que foi usado num ensaio de coloração fluorescente de células B transformadas por EBV, tal como descrito no Exemplo 4. Subsequentemente, os sobrenadantes dos pools positivos foram testados individualmente. As células de hibridoma positivas foram clonadas por três vezes por

diluição limitante em IMDM/FBS contendo 0,5 ng/ml de hIL-6. Os resultados da análise são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Resumo dos Dados da Fusão para Criação de Anticorpos Monoclonais contra o CD40 Humano e o B7 Humano

Fusão:	Anti-CD40	Anti-B7
Nº de poços semeados após a fusão	480 <sup>a</sup>	960
Nº de poços com crescimento de hibridoma	351	312
Nº de poços positivos <sup>b</sup>	4	1
Frequência de poços positivos <sup>c</sup>	1.15	0,31

<sup>a</sup>Apenas metade das células obtidas após a fusão foram analisadas.

<sup>b</sup>Tal como determinado por análise FACS, descrita no Exemplo 4.

<sup>c</sup>A frequência de poços positivos é definida como o número de poços positivos dividido pelo número total de poços com crescimento de hibridoma, multiplicado por 100.

### Exemplo 7

#### Teste de Células B das Amígdalas

Os linfócitos B das amígdalas foram isolados a partir de amígdalas obtidas de crianças submetidas a amigdalectomias, como descrito por deGroot et al. (1990). Abreviadamente, o tecido foi disperso usando lâminas de bisturi, as células fagocitárias e as células NK foram removidas por tratamento com éster metílico de L-leucina 5 mM e as células T foram removidas por meio de um ciclo de ensaio de rosetas com eritrócitos de carneiro tratados com brometo de 2-aminoetil-isotiourônio.

Os anticorpos monoclonais anti-(CD40) e anti-(B7) foram testados quanto à sua capacidade de ligação às células B das amígdalas usando o ensaio de coloração fluorescente de células acima descrito no Exemplo 4. Para a análise por coloração fluorescente das células B das amígdalas em cultura, usou-se iodeto de propídio para excluir as células mortas.

A Tabela 2 mostra os resultados da análise acima obtidos com a ligação de anticorpos monoclonais anti-(CD40) a uma cultura altamente enriquecida de células B das amígdalas.

Tabela 2  
Ligação de Anticorpos Monoclonais Anti-(CD40) a uma Cultura Altamente Enriquecida de Células B das Amígdalas

Anticorpo	Especificidade	% de Células Positivas <sup>a</sup>
OKT3	CD3	2,1
LeuM3	LeuM3	2,5
B1	CD20	88,0
G28.5	CD40	92,1
CD40-5H7	CD40	93,7
CD40-5D12	CD40	95,0
CD40-3C6	CD40	88,9
CD40-3A8	CD40	93,3

<sup>a</sup>A percentagem de células amigdalinas positivas foi medida por coloração fluorescente de células, tal como descrito no Exemplo 4.

Estes dados mostram que 89-95 por cento das células B das amígdalas isoladas de fresco tiveram um teste de coloração positivo com os quatro anticorpos monoclonais anti-(CD40).

A reacção das células B das amígdalas com o anticorpo monoclonal G28.5 (Clark et al.) foi testada essencialmente da mesma forma; aproximadamente a mesma percentagem de células exibiram positividade com o anticorpo G28.5 e com os anticorpos monoclonais anti-(CD40) do presente invento.

### Exemplo 8

#### Co-estimulação da Proliferação de Células B Usando mAbs Anti-CD40

Foram criados quatro hibridomas produzindo anticorpos monoclonais contra o CD40 humano, tal como descrito nos Exemplos 1-7. Verificou-se que estes mAbs se

ligavam a uma proporção semelhante de células B das amígdalas quando comparados com o mAb anti-CD40 G28.5. Ver de Boer et al., J. Immunol. Methods (1992) 152:15. Três destes anticorpos monoclonais (5D12, 3A8 e 3C6), que pertenciam à subclasse IgG2b, foram testados quanto à sua capacidade para fornecer sinais de ativação a células B humanas no ensaio de proliferação de células B abaixo descrito.

As células B amigdalinas humanas ( $4 \times 10^4$  células por poço) foram cultivadas em micropoços com 200  $\mu$ l de meio na presença de anti-IgM acoplado a esferas de Sepharose (5  $\mu$ g/ml) (Figura 7A) ou na presença de anti-IgM e de rIL-2 (100 U/ml) (Figura 7B). Foram adicionadas concentrações variáveis dos mAbs anti-CD40 S2C6, 5D12, 3C6 ou 3A8 e a incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina foi medida ao dia 3 após um período de pulsos de 18 h. Os dados apresentados na Figura 7A correspondem a médias que derivam de experiências com preparações de células B obtidas de três doadores diferentes, incubadas em duplicado. Os dados da Figura 7B correspondem a médias das incubações em duplicado de uma experiência em duas com resultados comparáveis.

Nenhum dos novos mAbs anti-CD40 mostrou co-estimular de modo significativo a proliferação de células B humanas na presença de anti-IgM imobilizada e de IL-2. Por contraste, o mAb anti-CD40 S2C6 co-estimulou a proliferação de células B humanas de um modo dependente da concentração.

## Exemplo 9

### Indução da Proliferação de Células B Usando mAbs Anti-CD40

Os mAbs testados no Exemplo 8 foram testados quanto à capacidade de induzir a proliferação das células B humanas no Ensaio Semelhante ao de Banchereau acima descrito, i.e., através da apresentação do mAb anti-CD40 por células aderentes expressando Fc $\gamma$ RII. Foram usadas como células apresentadoras do anticorpo as células transfectantes 3T6 de ratinho expressando a forma alélica HR do Fc $\gamma$ RII humano. Observou-se que o mAb anti-CD40 S2C6, juntamente com IL-4, induzia uma proliferação substancial de células B amigdalinas humanas neste sistema, tal como medido pela incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina. Os mAbs anti-CD40

5D12, 3C6 ou 3A8, no entanto, não induziram a proliferação de células B humanas neste sistema de cultura (dados não apresentados).

### Exemplo 10

#### Inibição da Proliferação de Células B Estimulada por S2C6 Usando mAbs Anti-CD40

Os mAbs anti-CD40 foram também testados quanto à sua capacidade de inibir a co-estimulação da proliferação de células B humanas pelo mAb anti-CD40 S2C6 usando o Ensaio de Proliferação de Células B acima descrito. As células B amigdalinas humanas ( $4 \times 10^4$  por poço) foram cultivadas em 200  $\mu$ l de meio, em microplacas, na presença de anti-IgM acoplado a esferas de Sepharose (5  $\mu$ g/ml) e do mAb anti-CD40 S2C6 (1,25  $\mu$ g/ml). Foram adicionadas concentrações variáveis dos mAbs anti-CD40 5D12, 3C6 ou 3A8 e a incorporação de [ $^3$ H]timidina foi avaliada após 3 dias. Como controlo, adicionou-se o mAb anti-(glucocerebrosidase) 8E4 em concentrações semelhantes. Barneveld et al., Eur. J. Biochem. (1983) 134:585. Os dados correspondem a médias  $\pm$  S.D. que derivam de experiências com células B obtidas de dois doadores diferentes, com incubações em duplicado.

Verificou-se que cada um dos mAbs anti-CD40 5D12, 3A8 e 3C6 tinha a capacidade de inibir a co-estimulação, pelo mAb S2C6, da proliferação de células B humanas induzida por anti-IgM (Figura 8). Por contraste, não se verificou uma inibição significativa com quantidades equivalentes do mAb não relevante 8E4, dirigido contra a  $\beta$ -glucocerebrosidase. Barneveld et al., supra. Assim, concluiu-se que estes mAbs anti-CD40 não forneciam sinais estimuladores da proliferação de células B humanas, mas que, inversamente, tinham a capacidade de inibir os sinais estimuladores exercidos pela activação do anticorpo anti-CD40 por outro mAb. Deste modo, estes mAbs foram considerados como excelentes ferramentas para investigar se a sinalização através do CD40 desempenha um papel na estimulação da proliferação de células B humanas efectuada pelas células EL4B5.

## Exemplo 11

### Efeitos dos mAbs Anti-CD40 sobre a Proliferação de Células B Humanas Induzida pelas Células EL4B5

Foi testado o efeito dos mAbs anti-CD40 sobre a proliferação de células B humanas induzida pelas células EL4B5, usando o Ensaio de Activação de Células B acima descrito. Cultivaram-se células B amigdalinas humanas (1000 por poço) juntamente com células EL4B5 irradiadas (50.000 por poço) na presença de 5% de sobrenadante de células T humanas activadas e de 5 ng/ml de PMA. Adicionaram-se os mAbs anti-CD40 5D12, 3C6 ou 3A8 a concentrações variáveis. Como controlo, adicionou-se o mAb MOPC-141 (IgG2b). Após seis dias de cultura, foi avaliada a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina.

A Figura 9 mostra que a adição dos mAbs anti-CD40 5D12, 3C6 ou 3A8 resultou numa inibição, dependente da concentração, da proliferação de células B humanas. Os dados correspondem a médias  $\pm$  S.D. que derivam de experiências com células B obtidas de quatro doadores diferentes, com incubações em duplicado. Os valores de incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina encontrados nas incubações sem mAb foram (médias  $\pm$  S.D.): 10460  $\pm$  1843 cpm, 6982  $\pm$  1729 cpm, 4362  $\pm$  1020 cpm e 1543  $\pm$  3190 cpm nas quatro experiências diferentes, respectivamente. A incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina pelas células B apenas correspondeu a 40  $\pm$  5 cpm e a incorporação pelas células EL4B5 apenas foi de 31  $\pm$  15 cpm.

Ocorreu uma inibição muito potente. A concentrações tão baixas como 10 ng/ml para cada, os três mAbs anti-CD40 5D12, 3C6 e 3A8 inibiram a proliferação de células B humanas por completo. Obteve-se metade da inibição máxima com uma concentração de cerca de 1 ng/ml. Por contraste, a proteína MOPC-141 de mieloma de ratinho correspondente ao isotipo IgG2b não exibiu um efeito significativo a nível da incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina. Observou-se uma inibição semelhante quando a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina foi avaliada ao dia 4 de cultura em lugar do dia 6, podendo deste modo excluir-se a possibilidade de o efeito observado se dever a uma alteração da cinética de proliferação sob influência do mAb anti-CD40 (dados não apresentados).

Para efeitos de comparação, foi investigada a influência de alguns mAb dirigidos contra outras estruturas de superfície das células B. O mAb anti-CD20 B1 ou o mAb anti-B7 B7-24 (este último mAb foi gerado por meio de um procedimento semelhante ao usado para a criação do mAb anti-CD40 usado na Figura 9) , em concentrações semelhantes às usadas nas experiências com o mAb anti-CD40, não tiveram qualquer efeito sobre a proliferação de células B humanas induzida pelas células EL4B5 (dados não apresentados). Deste modo, poderá concluir-se que o efeito inibidor do mAb anti-CD40 sobre a proliferação de células B induzida pelas células EL4B5 não se deve ao mascaramento da superfície da célula B.

### Exemplo 12

#### Efeitos da hCD40.H $\mu$ sobre a Proliferação de Células B Humanas Induzida pelas Células EL4B5

Com o objectivo de investigar se as células EL4B5 expressariam uma estrutura de membrana que se ligaria ao CD40, foi usada uma proteína de fusão (hCD40.H $\mu$ ), consistindo no domínio extracelular do CD40 e nos domínios constantes da IgM humana CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e CH<sub>4</sub>, para análise por fluorocitometria de fluxo. Lane et al., *supra*. As células EL4B5 não activadas não se ligam à proteína de fusão. No entanto, após cultura das células EL4B5 em conjunto com PMA (5 ng/ml) e com 5% de sobrenadante de células T humanas, constituindo estes dois elementos as condições necessárias à activação de células B humanas, verificou-se uma baixa actividade de ligação à hCD40.H $\mu$  (dados não apresentados). Esta pequena alteração de fluorescência foi consistentemente encontrada em três experiências independentes. O período mínimo de activação necessário para a indução da ligação ao CD40 foi de 24 horas. Para determinar se a ligação da hCD40.H $\mu$  às células EL4B5 inibiria a proliferação de células B humanas induzida pelas células EL4B5 tal como o fez o mAb antiCD40, a proteína de fusão foi titulada em co-culturas de células EL4B5 com células B humanas usando o Ensaio de Activação de Células B acima descrito. A Figura 10 mostra que a proteína de fusão inibiu de facto a incorporação de [<sup>3</sup>H]-timidina de um modo dependente da concentração e, tal como o mAb anti-CD40 que foi usado nas experiências

mostradas na Figura 9, evidenciou a capacidade de inibir por completo a proliferação de células B induzida pelas células EL4B5.

### Exemplo 13

#### Efeitos dos mAbs Anti-CD40 sobre a Produção de Anticorpos por Células B Humanas Induzida por Células T Humanas

Os anticorpos foram igualmente testados quanto à sua capacidade para inibir a produção de imunoglobulinas por parte de células B, estimuladas de modo dependente do contacto por células T activadas, usando o ensaio de células T helper acima descrito. Cultivaram-se células B amigdalinas humanas ( $10^4$ /poço) juntamente com células T purificadas irradiadas (3000 rad,  $10^5$ /poço) em placas de 96 poços, revestidas com mAb anti-CD3 e com ou sem mAbs diferentes para co-estimular as células T. Após 8 dias de cultura, os sobrenadantes foram recolhidos para a determinação da produção de imunoglobulinas por parte das células B. A produção de imunoglobulinas pelas células B foi avaliada por meio do ensaio de ELISA acima descrito. Adicionou-se o mAb anti-CD40 5D12 a concentrações variáveis desde o início das culturas. Como controlo, foi adicionado o mAb MOPC-141. A Figura 4A mostra que quando as células T foram estimuladas com o mAb imobilizado anti-CD3 e co-estimuladas com os mAbs solúveis anti-CD2 e anti-CD28, a adição do mAb anti-CD40 5D12 resultou numa inibição, dependente da concentração, da produção de IgG pelas células B humanas. A produção de IgM pelas células B foi inibida na mesma medida. Obtiveram-se resultados semelhantes com os mAbs anti-CD40 3C6 e 3A8 e com a proteína de fusão hCD40.h $\mu$ .

Os mAbs anti-CD40 desta invenção exibiram um efeito de inibição muito potente. A concentrações baixas, de aproximadamente 30 ng/ml, cada um dos três mAbs anti-CD40 proporcionou 50% da inibição máxima. Por contraste, a proteína MOPC-141 de mieloma de ratinho correspondente ao isotipo IgG2b não manifestou efeitos sobre a produção de imunoglobulinas.

O efeito inibidor manifestado pelos três mAbs anti-CD40 não foi específico do modo de activação das células T que proporcionou a actividade helper do ligando CD40. A Figura 4B mostra que, sob todas as condições de activação das células T

(anti-CD3 apenas; anti-CD3 + anti-CD2; anti-CD3 + anti-CD28; e anti-CD3 + anti-CD2 + anti-CD28), a adição do mAb anti-CD40 5D12 resulta numa forte inibição da produção de imunoglobulinas por parte das células B humanas. A inibição é comparável ao grau de inibição obtido com a proteína de fusão hCD40.h $\mu$ , a qual se sabe bloquear completamente a interacção CD40-ligando de CD40. A percentagem de inibição variou entre 40 e 70%, dependendo das condições de activação das células T humanas. Por contraste, a proteína MOPC-141 de mieloma de ratinho correspondente ao isotipo IgG2b, ou a IgM humana (como controlo para a proteína de fusão hCD40.h $\mu$ ), não manifestaram efeitos sobre a produção de imunoglobulinas por parte das células B humanas.

#### Deposição das Culturas

Os hibridomas usados nos exemplos acima foram aceites e depositados na American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, EUA, segundo os termos do Tratado de Budapeste. Esta deposição não indica que estes hibridomas sejam necessários para colocar em prática o invento acima descrito ou abaixo reivindicado.

Hibridoma	Data do Depósito	Nº de Acesso
3C6	6 de Maio de 1993	HB 11340
5D12	6 de Maio de 1993	HB 11339

O presente invento foi descrito por referência a formas de realização específicas. No entanto, este pedido de patente pretende abranger todas as alterações e substituições que possam ser realizadas pelos peritos na técnica sem que se abandone o espírito e o âmbito das Reivindicações anexas.

#### **Referências**

Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Media, PA.

Bohinski, R.C., Modern Concepts in Biochemistry, 2ª Ed., Alyn and Bacon, Inc.

- Carroll, W.P., Thielemans, K., Dille, J., e Levy, R. (1986) J. Immunol. Methods **89**:61.
- Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry **17**:5294 (1979).
- Clark, E.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:4494 (1986).
- Coon, J.S. et al., (eds.) Diagnostic Flow Cytometry, Academy of Pathology Inc. (1991).
- Crea, R., Patente dos EUA nº 4.888.286, de 19 de Dezembro de 1989.
- de Boer, M. et al., J. Immunol. Methods **113**:143 (1988).
- DeGroot, C. et al., Lymphokine Research **9**:321 (1990).
- DiSanto, J.P. et al., J. Immunol. Methods **141**:123 (1991).
- Eaton, M.A.W. et al., Patente dos EUA nº 4.719.180, de 12 de Janeiro de 1988.
- Freedman, A.S. et al., J. Immunol. **139**:3260 (1987).
- Freeman, G.J. et al., J. Immunol. **143**:2714 (1989).
- Harlow, E. et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).
- Huynh, T.V. et al., em "DNA cloning, volume 1", ed. D.M. Glover, Washington D.C.: IRL Press, 1985 (Capítulo 2).
- Keren, D.F. (editor), Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, American Society of Clinical Pathologists (1989).
- Lackow, V.A. et al., "Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors", em Recombinant DNA Technology and Applications (C. Ho., A. Prokop e R. Bajpai, eds.), McGraw-Hill, NY (1991).
- Luckow, V.A. et al., Virology **170**:31 (1989).
- Maiorella, B. et al., Biotechnology **6**:1406 (1988).
- Maniatis, T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY (1982).
- Matsuura, Y. et al., J. Gen. Vir. **68**(pt.5):1233-1250 (1987).
- Miller, L.K. (1988) em Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Rodriguez, R.L. e Denhardt, D.T., eds., Butterworths, Boston.
- Mishell, B.B. e Shiigi, S.M., eds. (1980), Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Mullis, K.B., Patente dos EUA nº 4.683.202, de 28 de Julho de 1987.

Mullis, K.B. et al., Patente dos EUA nº 4.683.195, de 28 de Julho de 1987.

Nyunoya, H. et al., AIDS Res. Hum. Retrovir. 6(11):1311-1321 (1990).

Paulie, S. et al., Cancer Immunol. Immunother. 20:23 (1985).

Perkins, S. et al. (1989) em Borrebaeck, C.A.K., Hagen, I. (eds.), Electromanipulation in Hybridoma Technology, A Laboratory Manual, Stockton Press, New York.

Perkins, S., Zimmerman, U., Fong, S.K.H. (1991) Hum. Antibod. Hybridomas 2: 155-159.

Powers, L.W., Diagnostic Hematology: Clinical and Technical Principles, C.V. Mosby Company (1989).

Sambrook, J. et al., em Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. 2 (1989).

Saiki, R.K. et al., Science 230:1350 (1985).

Saiki, R.K. et al., Science 239:487 (1988).

Sekine, H. et al., Gene 65(2):187-193 (1988).

Stamenkovic, I. et al., EMBO J. 8:1403 (1989).

Summers, M.D. et al., A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin, Nº 1555 (1987).

Takehara, K. et al., J. Gen. Virol. 69(pt.11):2763-2777 (1988).

Valle, A. et al., Immunology 69:531 (1990).

Webb, N.R. et al., Technique 2:173 (1990).

Webb, N.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7731 (1989).

Wu, A.Z. et al., Chin. J. Biotech. 6(4):237-242 (1990).

Yokochi, T. et al., J. Immunol. 128:823 (1982).

Yoshio, T. et al., Patente dos EUA nº 4.849.350, de 18 de Julho de 1989.

Lisboa, 12 de Dezembro de 2006

## **REIVINDICAÇÕES**

**1-** Um anticorpo monoclonal ou seu fragmento que possui a capacidade de se ligar a um antigénio CD40 humano localizado na superfície de uma célula B humana, caracterizado por a ligação do anticorpo ou do seu fragmento ao antigénio CD40 evitar o crescimento ou diferenciação da célula B.

**2-** Um anticorpo monoclonal, de acordo com a Reivindicação Nº.1, caracterizado por ser seleccionado entre o 5D12 produzido pelo hibridoma ATCC HB 11339 e o 3C6 produzido pelo hibridoma ATCC HB 11340.

**3-** Um anticorpo monoclonal ou fragmento, de acordo com as Reivindicações Nº.1 ou Nº.2, caracterizado por ser humanizado.

**4-** Um anticorpo monoclonal ou fragmento, de acordo com a Reivindicação Nº.3, caracterizado por o dito fragmento corresponder a um fragmento Fab', F(ab')<sub>2</sub> ou F<sub>v</sub>.

**5-** Um hibridoma com a capacidade de produzir um anticorpo monoclonal possuindo especificidade para o antigénio CD40 de uma célula B humana, caracterizado por a ligação do dito anticorpo monoclonal a um antigénio CD40, expresso à superfície de uma célula B humana, inibir o crescimento ou a diferenciação da célula B.

**6-** Um hibridoma, de acordo com a Reivindicação Nº.5, caracterizado por corresponder ao 5D12 com o número de depósito ATCC HB 11339.

**7-** Um hibridoma, de acordo com a Reivindicação Nº.5, caracterizado por produzir o anticorpo monoclonal 3C6 com o número de depósito ATCC HB 11340.

**8-** O uso de um anticorpo monoclonal anti-CD40 ou um seu fragmento, possuindo a capacidade de se ligar a um antigénio CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana, para o fabrico de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma doença mediada por anticorpos num paciente, caracterizado por a ligação do anticorpo ou seu fragmento ao antigénio CD40 evitar o crescimento ou diferenciação da célula B.

**9-** O uso, de acordo com a Reivindicação Nº.8, caracterizado por a doença mediada por anticorpos ser seleccionada a partir do grupo que consiste em

doença mediada por IgE, lúpus eritematoso sistémico (LES), cirrose biliar primária (CBP) e púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).

**10-** O uso de um anticorpo monoclonal anti-CD40 ou um seu fragmento, possuindo a capacidade de se ligar a um antigénio CD40 humano localizado à superfície de uma célula B humana, para o fabrico de um medicamento para a inibição da proliferação de células B humanas, caracterizado por a proliferação das ditas células B humanas ser aumentada pela interacção de um ligando de CD40 com um antigénio CD40 expresso à superfície das ditas células B, e a ligação do dito anticorpo monoclonal anti-CD40 ao dito antigénio CD40 evitar o crescimento ou diferenciação da dita célula B.

**11-** Uma composição farmacêutica caracterizada por compreender:

- a) um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento possuindo a capacidade de se ligar especificamente a um antigénio CD40 humano expresso à superfície de uma célula B humana, em que a ligação do anticorpo ou seu fragmento ao antigénio CD40 evita o crescimento ou diferenciação da célula B; e
- b) um excipiente farmacêutico.

**12-** A composição farmacêutica, de acordo com a Reivindicação Nº.11, caracterizada por o anticorpo monoclonal corresponder ao definido pelas Reivindicações Nº.2, Nº.3 ou Nº.4.

Lisboa, 12 de Dezembro de 2006

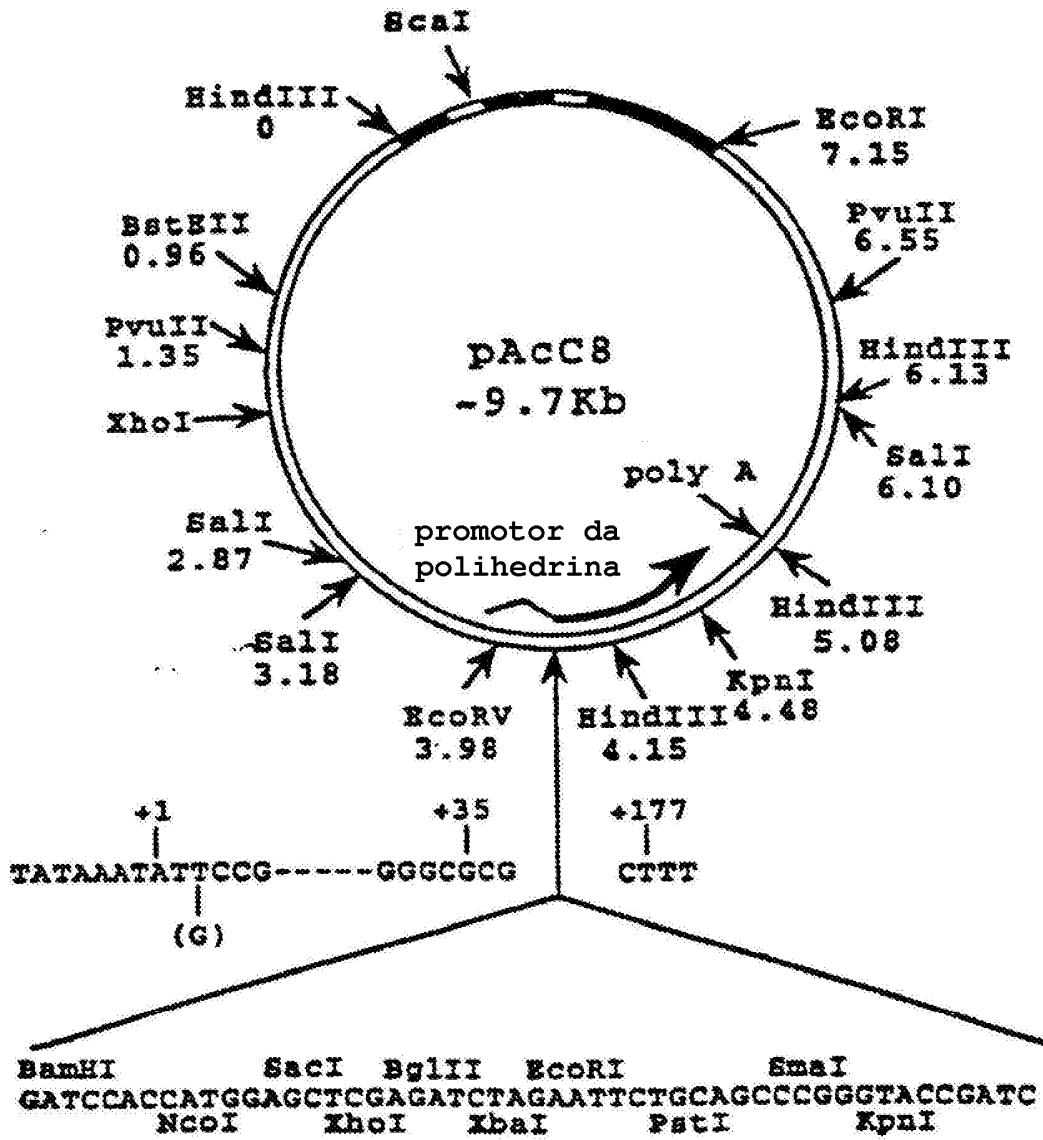


Fig. 1A

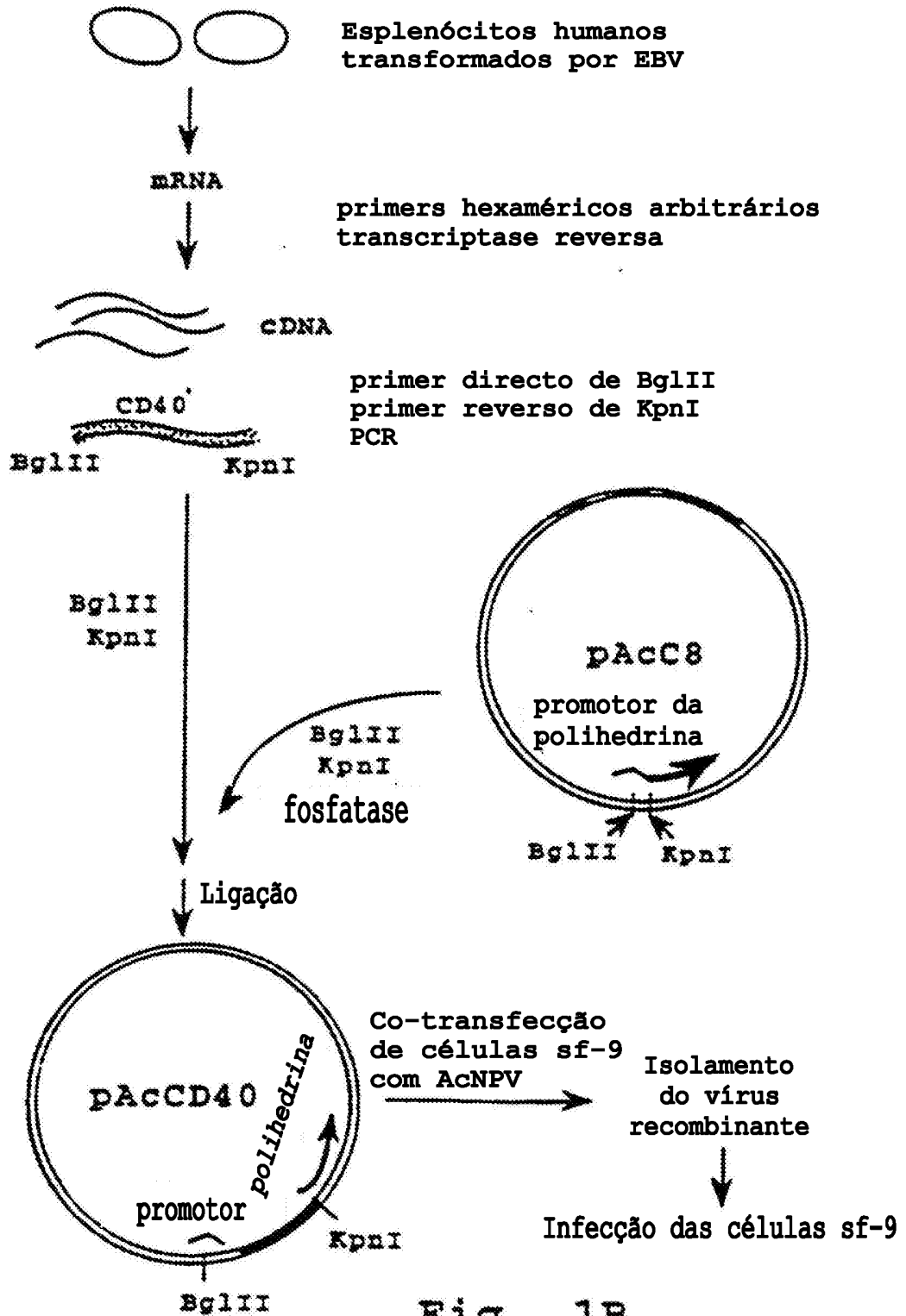


Fig. 1B



FIG. 3:

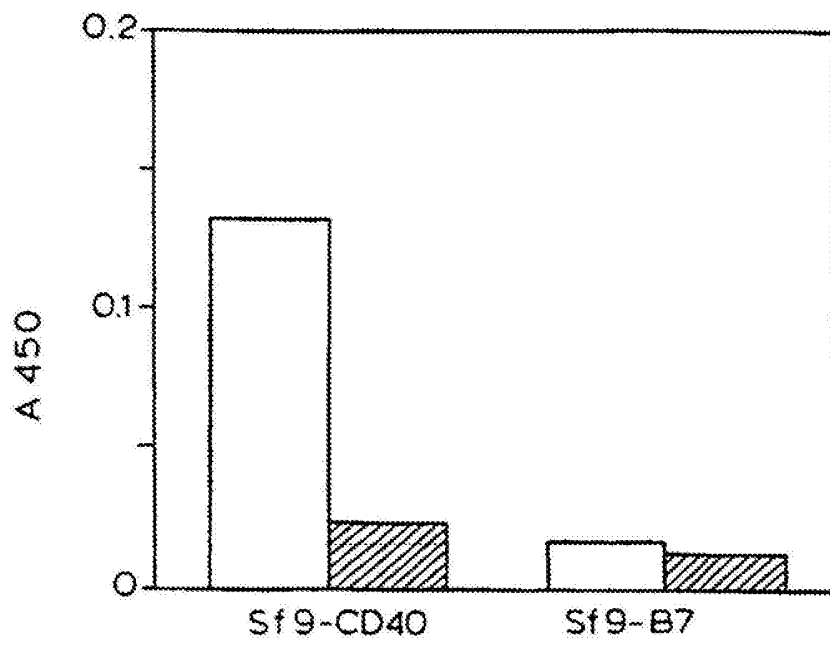


Fig. 4A

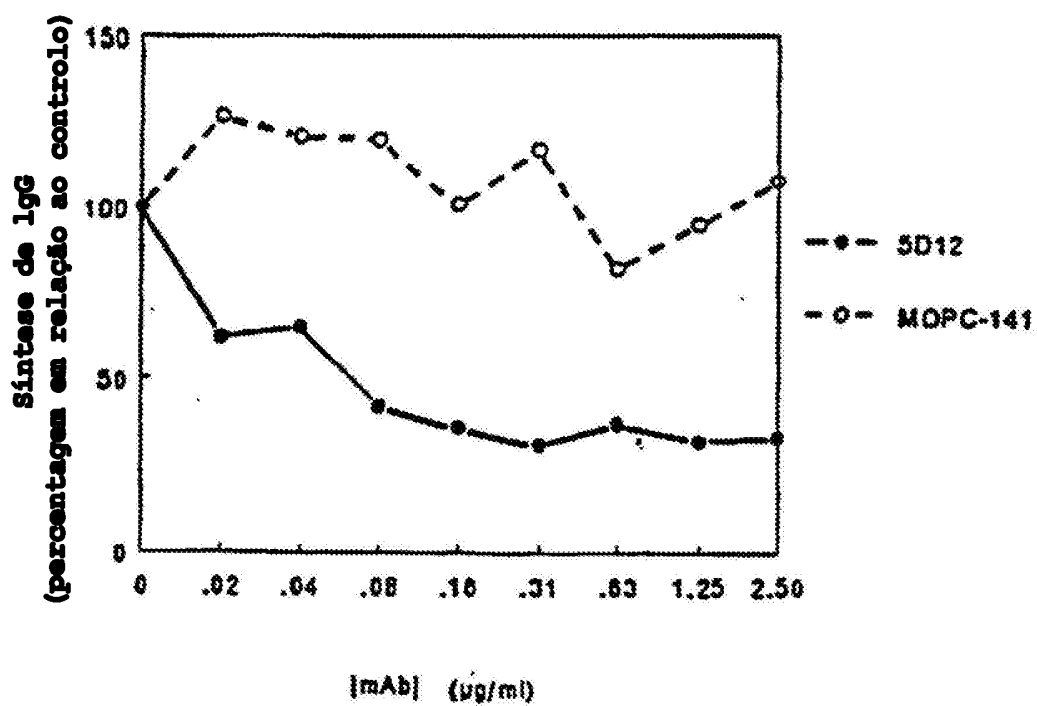


Fig. 4B

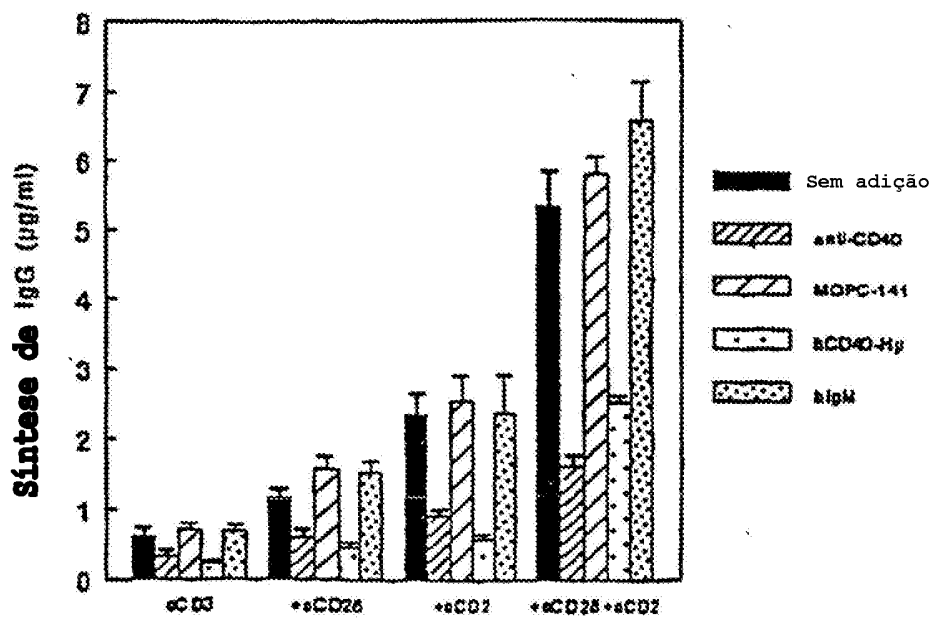


FIG. 5A

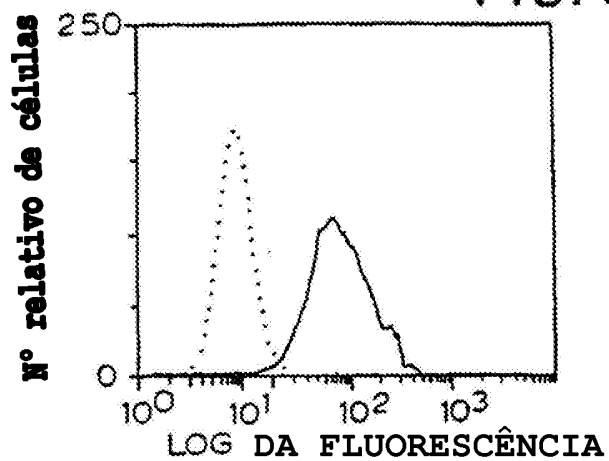


FIG. 5B

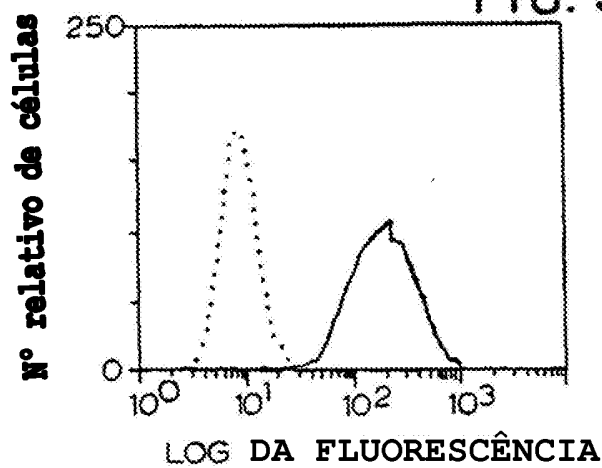
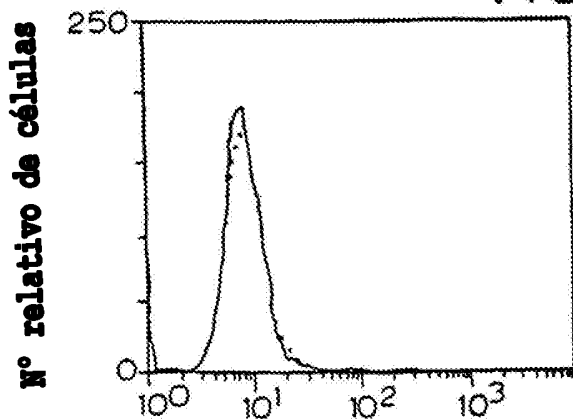


FIG. 5C



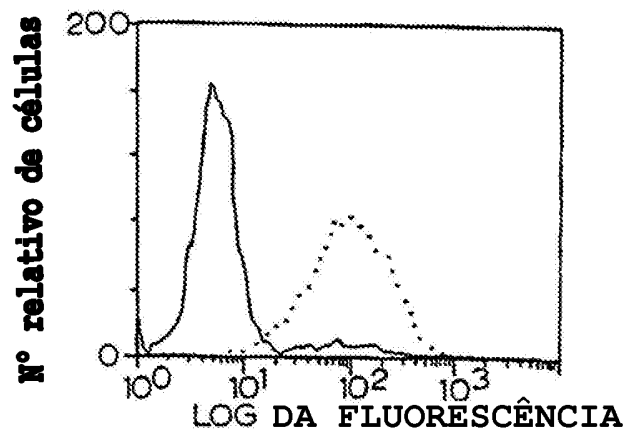


FIG. 6A

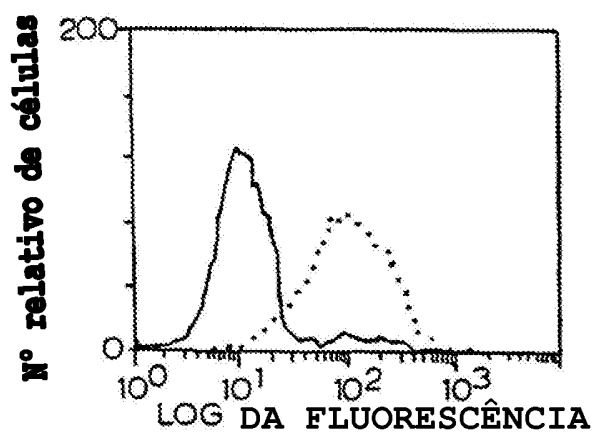


FIG. 6B

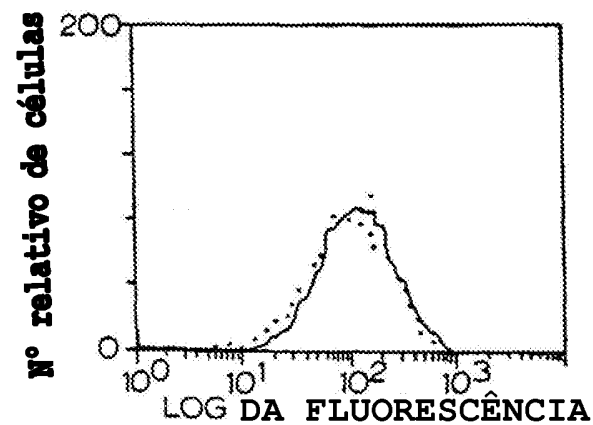
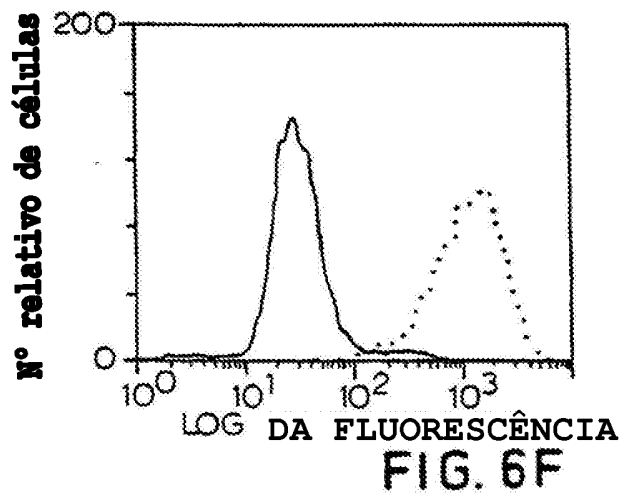
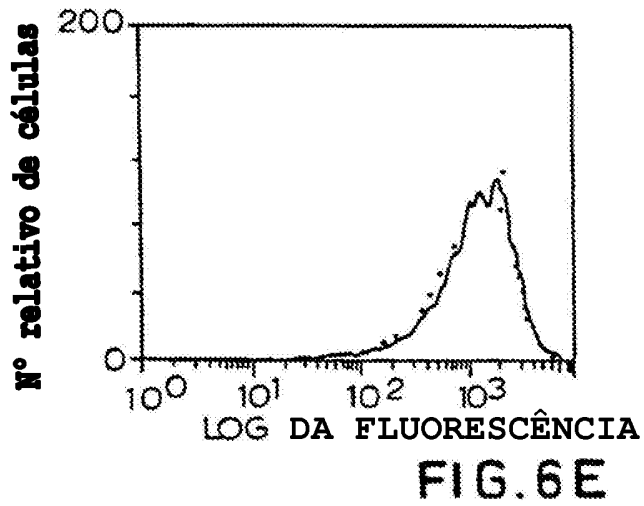
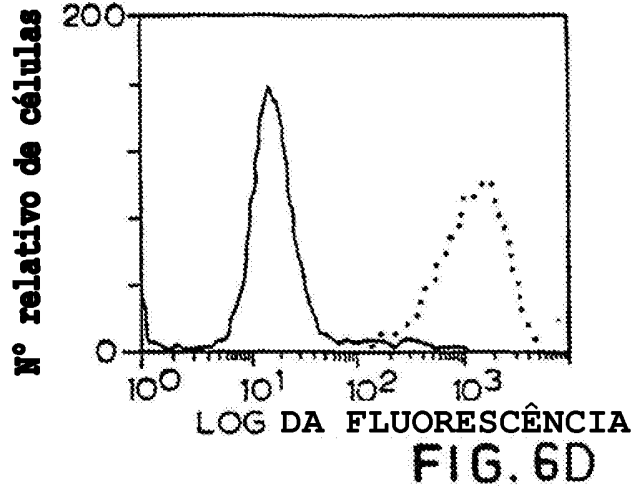


FIG. 6C



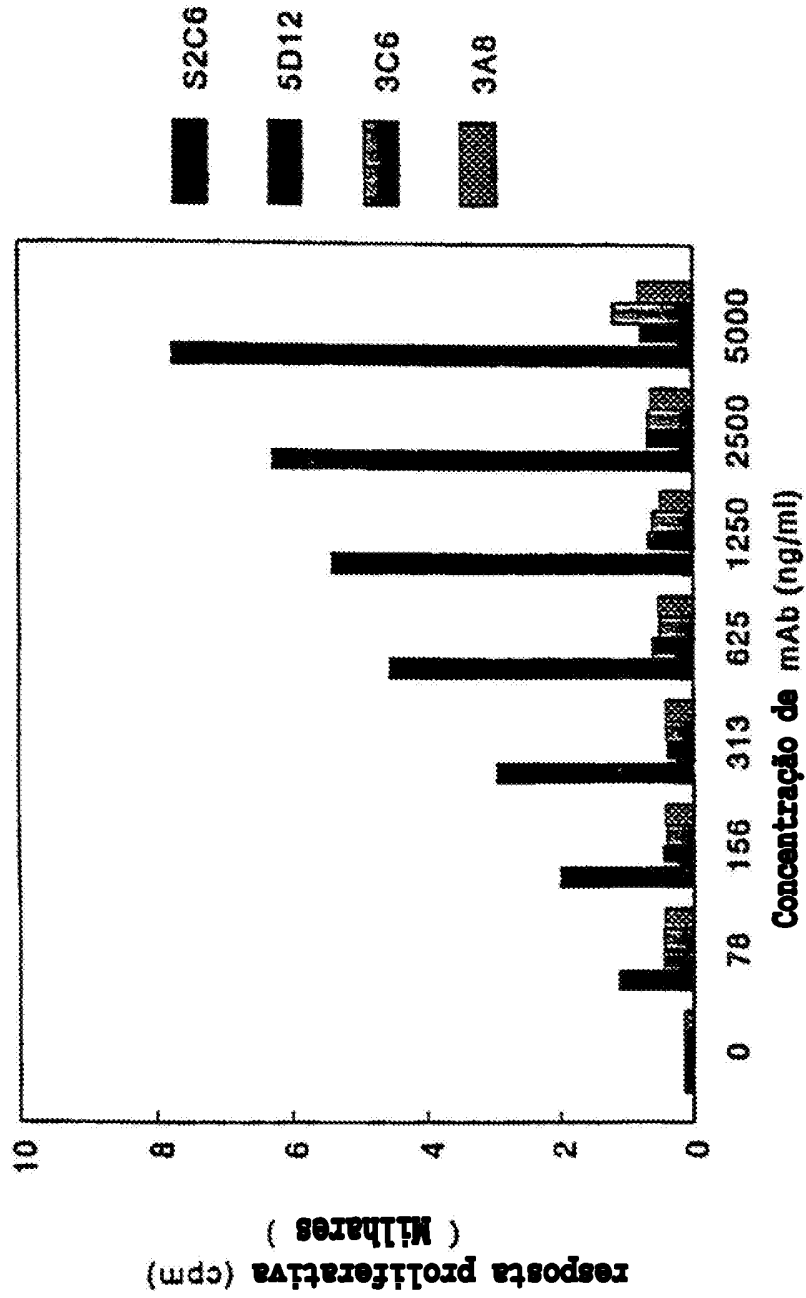


FIG. 7 A

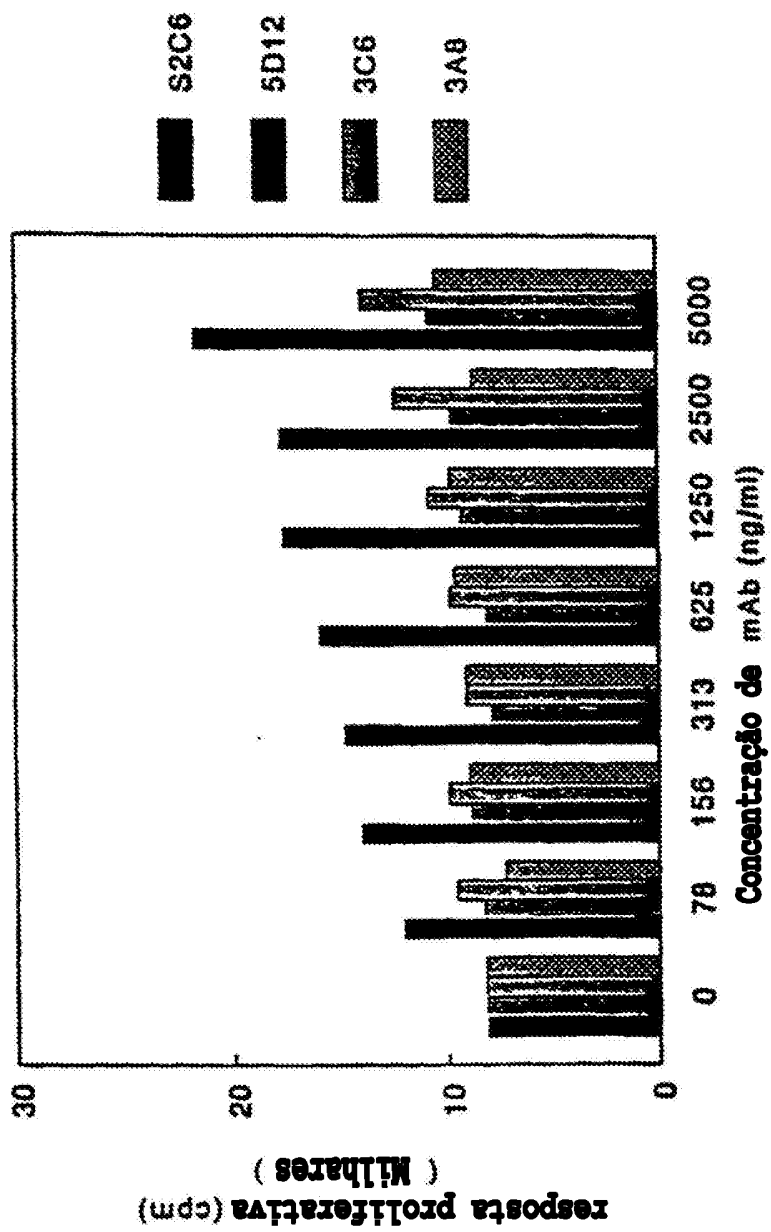


FIG. 7B

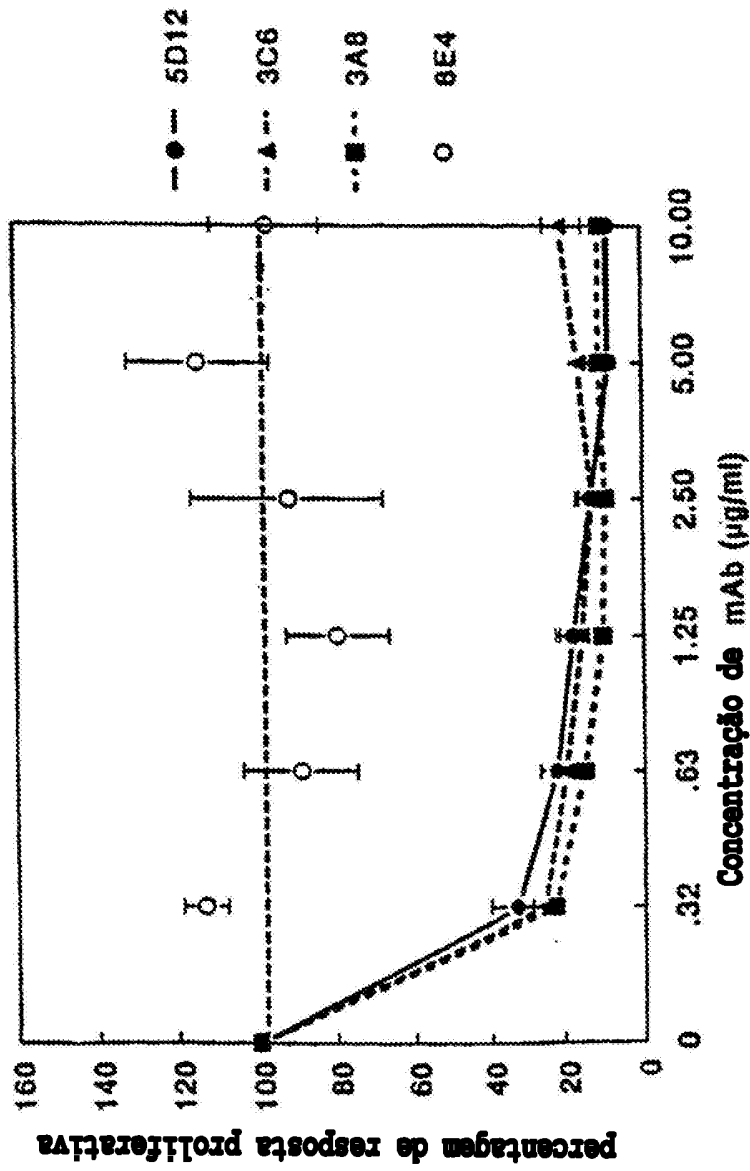


FIG. 8

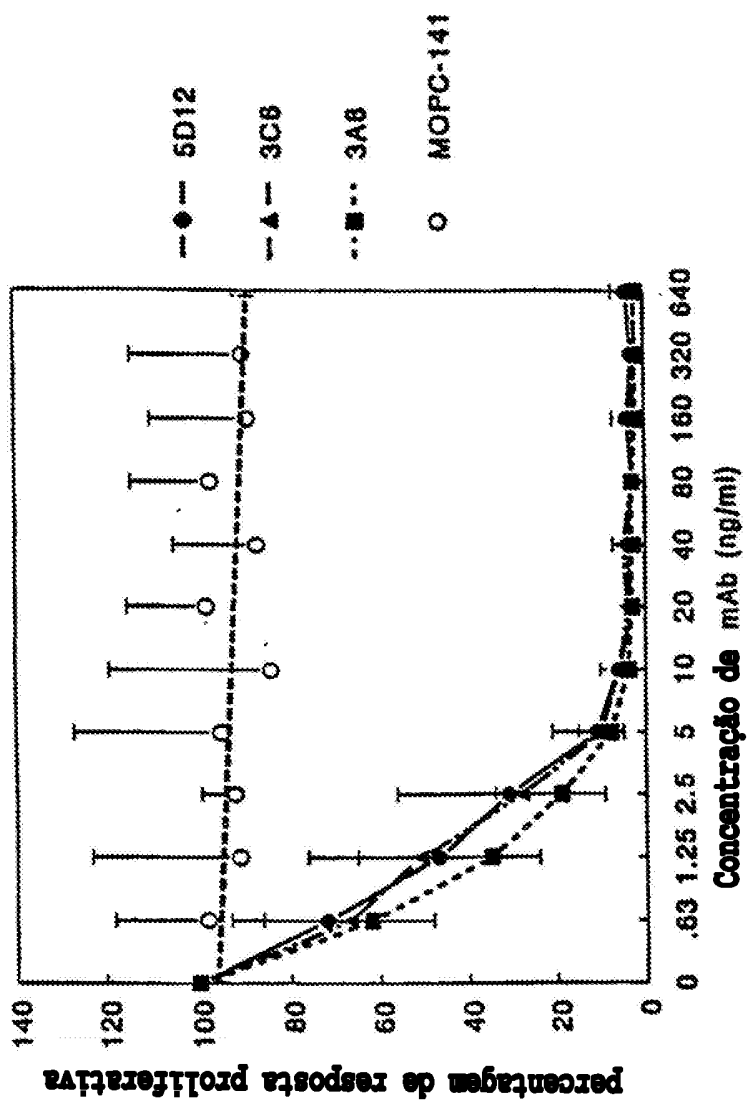


FIG. 9

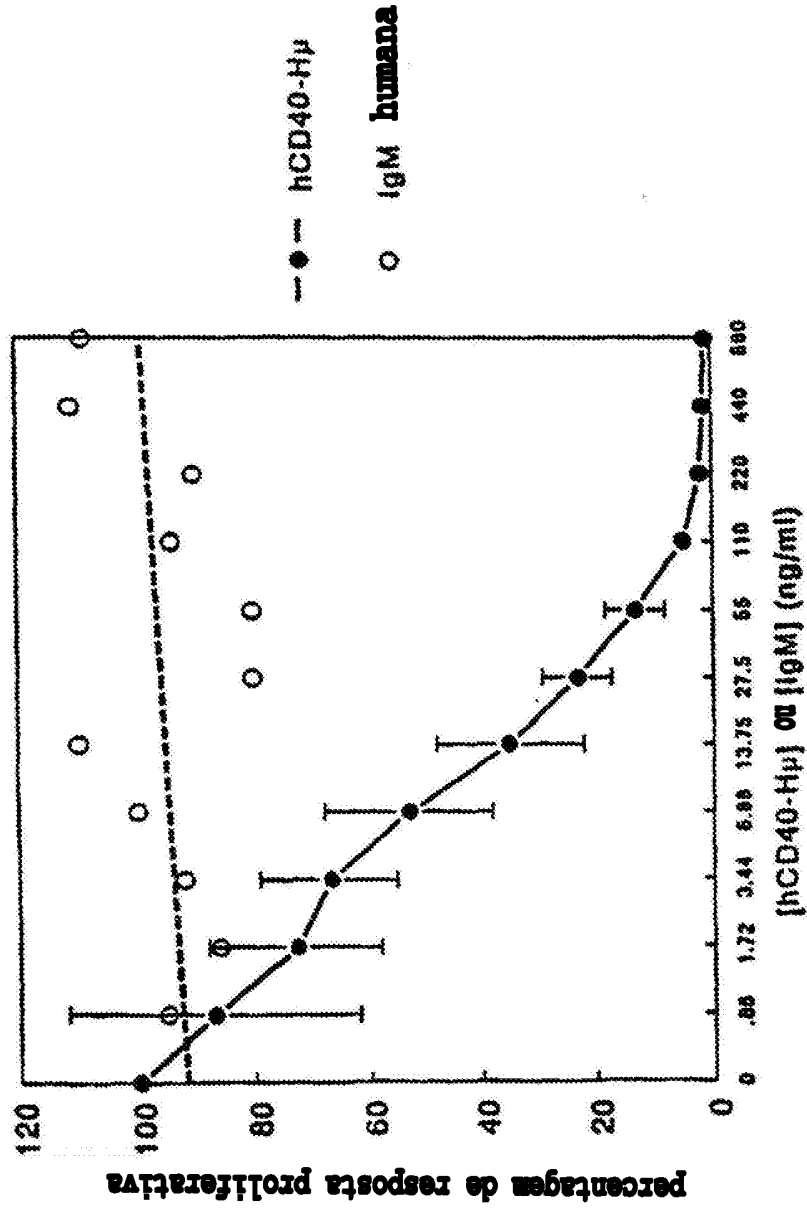


FIG.10