



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

(21) PI0710826-5 A2



(22) Data de Depósito: 17/04/2007
(43) Data da Publicação: 23/08/2011
(RPI 2120)

(51) Int.CI.:
C07K 16/28 2006.01

(54) Título: COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS DE ANTICORPO ANTI-CD40 ANTAGONISTA

(30) Prioridade Unionista: 21/04/2006 US 60/794.011

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

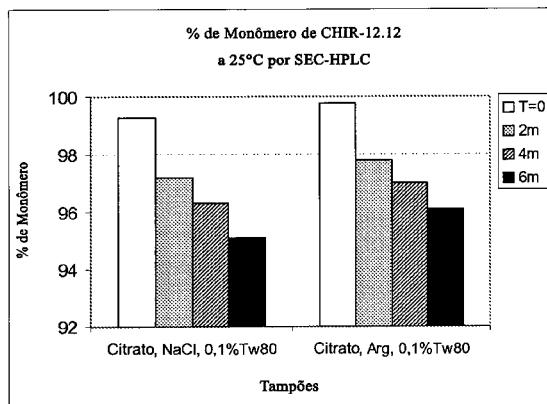
(72) Inventor(es): Augustus Okhamafe, Bao-Lu Chen, Kidisti Araya, Xiaofeng Lu

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2007066757 de 17/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/124299de 01/11/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS DE ANTICORPO ANTI-CD40 ANTAGONISTA Composições farmacêuticas líquidas estáveis compreendendo um anticorpo anti-CD40 antagonista como um componente terapeuticamente ou farmaceuticamente ativo e métodos úteis na sua preparação são fornecidos. Estas composições compreendem o antagonista anti-CD40, um agente de tamponamento para manter o pH da composição entre cerca de 5,0 e cerca de 7,0, e uma quantidade de arginina-HCl suficiente para tornar a composição líquida quase isotônica. As composições farmacêuticas contendo anticorpo anti-CD40 antagonista líquido estável da invenção encontram uso em métodos para tratar doenças proliferativas e doenças possuindo um componente autoimune e/ou inflamatório.



PI 0710826-5

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE ANTICORPO ANTI-CD40

ANTAGONISTA

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está direcionada ao campo das formulações farmacêuticas, mais particularmente a composições farmacêuticas líquidas estáveis compreendendo anticorpos anti-CD40 antagonistas para uso no tratamento de doenças proliferativas e doenças possuindo um componente auto-imune ou inflamatório.

10 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Avanços recentes no desenvolvimento de tecnologia de engenharia genética forneceram uma variedade de polipeptídeos biologicamente ativos em quantidades suficientemente grandes para uso como drogas. Os polipeptídeos, entretanto, podem perder atividade biológica como um resultado de instabilidades físicas, incluindo desnaturação e formação de agregados solúveis e insolúveis, e uma variedade de instabilidades químicas, como hidrólise, oxidação e desamidação. A estabilidade de polipeptídeos em formulações farmacêuticas líquidas pode ser afetada, por exemplo, por fatores como pH, força iônica, temperatura, ciclos repetidos de congelamento-descongelamento, e exposição a forças de cisalhamento mecânicas como ocorre durante o processamento. Formação de agregados e perda de atividade biológica podem também ocorrer como um resultado de agitação física e interfaces de moléculas de polipeptídeos em solução e na interação líquido-ar em frascos de armazenamento. Mudanças adaptáveis adicionais podem ocorrer nos polipeptídeos adsorvidos a interfaces ar-líquido e sólido-líquido durante a compressão-extensão das

interfaces resultando da agitação durante o transporte ou outros contextos. Tal agitação pode fazer com que a proteína emaranhe, agregue, forme partículas e, finalmente, precipite com outras proteínas adsorvidas. Para uma análise 5 geral de estabilidade de produtos farmacêuticos de proteína, ver, por exemplo, Manning e outros, (1989) *Pharm. Res.* 6:903-918, e Wang e Hanson, (1988) *J. Parenteral Sci. Tech.* 42:S14.

A instabilidade de formulações farmacêuticas líquidas 10 contendo peptídeos estimulou a embalagem destas formulações sob a forma liofilizada juntamente a um meio líquido adequado para reconstituição. Embora a liofilização melhore a estabilidade da composição em armazenamento, muitos polipeptídeos demonstram uma atividade reduzida, seja 15 durante o armazenamento no estado seco (Pikal, (1990) *Biopharm.* 27:26-30) ou como um resultado de formação de agregado ou perda de atividade catalítica na reconstituição como uma formulação líquida (ver, por exemplo, Carpenter e outros, (1991) *Develop. Biol. Standard* 74:225-239; 20 Broadhead e outros, (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 75:1169-1206; Mumenthaler e outros, (1994) *Pharm. Res.* 77:12-20; Carpenter e Crowe, (1988) *Cryobiology* 25:459-470; e Roser, (1991) *Biopharm.* 4:47-53). Enquanto o uso de aditivos tem 25 melhorado a estabilidade de proteínas secas, muitas formulações rehidratadas continuam a possuir quantidades inaceitáveis ou indesejáveis de proteína agregada inativa (ver, por exemplo, Townsend e DeLuca, (1983) *J. Pharm. Sci.* 80:63-66; Hora e outros, (1992) *Pharm. Res.* 9:33-36; Yoshiaka e outros, (1993) *Pharm. Res.* 70:687-691). Também, 30 a necessidade de reconstituição é uma inconveniência e

introduz a possibilidade de dosagem incorreta.

Anticorpos monoclonais produzidos de maneira recombinante estão incluídos nos polipeptídeos úteis farmaceuticamente. Entre esta classe de agentes terapêuticos, os anticorpos anti-CD40 antagonistas tendo como alvo o membro CD40 receptor da família TNF demonstra ser uma grande promessa para o tratamento de malignidades relacionadas a célula B e malignidades não hematológicas, assim como doenças possuindo um componente auto-imune e/ou inflamatório. O receptor de CD40 é um antígeno de superfície celular de 50 a 55 kDa presente na superfície de células B humanas tanto neoplásticas quanto normais, células dendríticas, monócitos, macrófagos, células T CD8⁺, células endoteliais, monocíticas e epiteliais, alguns carcinomas epiteliais e muitos tumores sólidos, incluindo cânceres de pulmão, mama, ovário, bexiga e cólon. O antígeno de CD40 é também expresso em células T ativadas, plaquetas ativadas, células musculares lisas vasculares inflamadas, eosinófilos, membranas sinoviais em artrite reumatóide, fibroblastos dérmicos, e outros tipos de célula não linfóide. Dependendo do tipo de célula expressando CD40, a ligação pode induzir a adesão, diferenciação, ativação e proliferação intercelular.

Por exemplo, a ligação de CD40 a seu ligante cognato, CD40L (também denominado CD 154), estimula a proliferação e diferenciação de células B em células de plasma, produção de anticorpo, mudança de isótipo, e geração de memória de célula B. Durante a diferenciação de células B, CD40 é expresso em células pré-B mas se perde na diferenciação nas células de plasma. A expressão de CD40 em APCs desempenha

um papel co-estimulador importante na ativação destas células. Por exemplo, anticorpos monoclonais de anti-CD40 agonistas (mAbs) mostraram imitar os efeitos de células T auxiliares na ativação de células B. Quando apresentados em 5 células aderentes expressando Fc γ RII, estes anticorpos induzem a proliferação de célula C (Banchereau e outros, (1989) *Science* 251:70). Mais ainda, mAbs anti-CD40 agonistas podem substituir o sinal de T auxiliar para secreção de IgM, IgG e IgE na presença de IL-4 (Gascan e 10 outros, (1991)/. *Immunol.* 147:8). Além disso, mAbs anti-CD40 agonistas podem evitar a morte de células programadas (apoptose) de células B isoladas de linfonodos.

Estas e outras observações apóiam a atual teoria de que a interação de CD40 e CD40L desempenham um papel essencial na regulação de respostas imunes humorais e mediada por célula. Estudos mais recentes revelaram um papel muito mais amplo da interação CD40/CD40L em diversos processos fisiológicos e patológicos.

Assim, o acoplamento de CD40 por CD40L e subsequente 20 ativação da sinalização de CD40 são etapas necessárias para respostas imunes normais; entretanto, a desregulação da sinalização CD40 pode levar à doença. Têm-se mostrado que o caminho da sinalização CD40 está envolvido em doença autoimune (Ichikawa e outros, (2002) *J. Immunol.* 169:2781- 25 2787 e Moore e outros, (2002) *J. Autoimmun.* 19:139-145). Adicionalmente, a interação CD40/CD40L desempenha um papel importante em processos inflamatórios. Por exemplo, tanto CD40 quanto CD40L são superexpressados em lesões de arteriosclerose humana e experimental. O estímulo de CD40 30 induz a expressão de enzimas de degradação de matriz e

expressão de fator de tecido em tipos de célula associados a ateroma, como células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos. Além disso, o estímulo de CD40 induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e 5 IL-8 e moléculas de adesão como ICAM-1, E-selectina e VCAM. A inibição da interação CD40/CD40L evita a aterogênese em modelos animais. Em modelos de transplante, o bloqueio da interação CD40/CD40L evita a inflamação. Foi mostrado que a ligação CD40/CD40L age sinergisticamente com o peptídeo 10 amilóide-beta de Alzheimer para promover a ativação microglial, levando assim a neurotoxicidade. Em pacientes com artrite reumatóide (RA), a expressão de CD40 é aumentada em condrócitos articulares, assim, a sinalização CD40 provavelmente contribui para a produção de citocinas 15 danosas e metaloproteinases de matriz. Ver Gotoh e outros, (2004) *J. Rheumatol.* 31:1506-1512.

De forma similar, células B malignas de tipos de tumor de linhagem de células B expressam CD40 e parecem depender da sinalização CD40 para sobrevivência e proliferação. 20 Células transformadas de pacientes com linfomas de células B de baixo ou alto grau, leucemia linfoblástica aguda de células B, mieloma múltiplo, leucemia linfocítica crônica, macroglobulinemia de Waldenstrom e doença de Hodgkin expressam CD40. A expressão de CD40 é também detectada em 25 dois terços dos casos de leucemia mieloblástica aguda e 50% dos linfomas relacionados à AIDS.

Um número de carcinomas e sarcomas também exibe altos níveis de expressão de CD40, embora o papel da sinalização CD40 em relação à expressão de CD40 nestas células 30 cancerosas seja menos compreendido. Os carcinomas

expressando CD40 incluem carcinoma de bexiga (Paulie e outros, (1989) *J. Immunol.* 142:590-595; Braesch-Andersen e outros, (1989) *J. Immunol.* 142:562-567), carcinoma de mama (Hirano e outros, (1999) *Blood* 93:2999-3007; Winget et al., (1998) *Breast Cancer Res. Treat.* 50:27-36); câncer de próstata (Rokhlin e outros, (1997) *Cancer Res.* 57:1758-1768), carcinoma de célula renal (Kluth e outros, (1997) *Cancer Res.* 57:891-899), carcinoma indiferenciado nasofaringeal (UNPC) (Agathangelou e outros, (1995) *Am. J. Pathol.* 147:1152-1160), carcinoma de célula escamosa (SCC) (Amo e outros, (2000) *Eur. J. Dermatol.* 10:438-442; Posner e outros, (1999) *Clin. Cancer Res.* 5:2261-2270), carcinoma papilar de tireóide (Smith e outros, (1999) *Thyroid* 9:749-755), melanoma maligno cutâneo (van den Oord e outros, (1996) *Am. J. Pathol.* 149:1953-1961), carcinoma gástrico (Yamaguchi e outros, (2003) *Int. J. Oncol.* 23(6): 1697-702), e carcinoma de fígado (ver, por exemplo, Sugimoto e outros, (1999) *Hepatology* 30(4):920-26, discutindo carcinoma hepatocelular humano). Para sarcomas expressando CD40, ver, por exemplo, Lollini e outros, (1998) *Clin. Cancer Res.* 4(8): 1843-849, discutindo osteosarcoma humano e sarcoma de Ewing.

Dados os benefícios terapêuticos potenciais de anticorpos anti-CD40 antagonistas na regulação de sinalização de CD40 mediada por CD40L em vários cânceres e doenças auto-imunes/inflamatórias, e os desafios de formular estes polipeptídeos, composições farmacêuticas estáveis compreendendo estes anticorpos se fazem necessárias.

30 **BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Composições farmacêuticas líquidas estáveis compreendendo um anticorpo anti-CD40 antagonista como um componente terapeuticamente ou profilaticamente ativo e métodos úteis em sua preparação são fornecidos. Estas 5 composições compreendem o anticorpo anti-CD40 antagonista, um agente de tamponamento para manter o pH da composição entre cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0 e uma quantidade de arginina-HCl suficiente para tornar a composição líquida quase isotônica. Em algumas modalidades, o agente de 10 tamponamento é um tampão citrato/ácido cítrico, o anticorpo anti-CD40 antagonista é o CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação a antígeno destes, a composição compreende arginina-HCl como o agente 15 isotonificante, e a composição compreende ainda um tensoativo não iônico e/ou L-metionina como agentes estabilizantes adicionais. O anticorpo anti-CD40 antagonista líquido estável contendo as composições farmacêuticas da invenção encontram uso em métodos para o tratamento de doenças proliferativas e doenças possuindo um 20 componente autoimune e/ou inflamatório.

BREVE DESCRIÇÃO DAS DIVERSAS VISTAS DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra o efeito de espécies de tampões na pureza de formulação de mAb CHIR-12.12 armazenadas a 25°C por 3 meses ou 5 meses conforme medido por análise de SEC-HPLC. 25

A Figura 2 mostra o efeito de espécies de tampões na formação de agregado de mAb CHIR-12.12 nas várias formulações de anticorpo armazenadas a 25°C por 3 meses ou 5 meses conforme medido por análise de SEC-HPLC.

30 A Figura 3 mostra o efeito de espécies de tampões na

fragmentação de mAb CHIR-12.12 nas várias formulações de anticorpo armazenadas a 25°C por 3 meses ou 5 meses conforme medido por análise de SEC-HPLC.

A Figura 4 mostra o efeito de espécies de tampões na pureza de formulação de mAb CHIR-12.12 armazenadas a 40°C por 3 meses ou 5 meses conforme medido por análise de SEC-HPLC.

A Figura 5 mostra o efeito de espécies de tampões na formação de agregado de mAb CHIR-12.12 nas várias formulações de anticorpo armazenadas a 40°C por 3 meses ou 5 meses conforme medido por análise de SEC-HPLC.

A Figura 6 mostra o efeito de espécies de tampões na fragmentação de mAb CHIR-12.12 nas várias formulações de anticorpo armazenadas a 40°C por 3 meses ou 5 meses conforme medido por análise de SEC-HPLC.

A Figura 7 mostra termogramas de calorimetria diferencial de varredura para mAb CHIR-12.12 nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como agente isotonificante.

A Figura 8 mostra o percentual de forma de monômero de mAb CHIR-12.12 restante nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenado a 25°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por SEC-HPLC.

A Figura 9 mostra o percentual de forma de monômero de mAb CHIR-12.12 restante nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenado a 25°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por SEC-HPLC.

A Figura 10 mostra o percentual de fragmentos de mAb

CHIR-12.12 nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 25°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por SEC-HPLC.

A Figura 11 mostra o percentual de forma de monômero de mAb CHIR-12.12 restante nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 40°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por SEC-HPLC.

A Figura 12 mostra o percentual de agregados de mAb CHIR-12.12 nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 40°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por SEC-HPLC.

A Figura 13 mostra o percentual de fragmentos de mAb CHIR-12.12 nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 40°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por SEC-HPLC.

A Figura 14 mostra o percentual de pureza de mAb CHIR-12.12 nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 25°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por CIEX-HPLC.

A Figura 15 mostra o percentual de variantes ácidas de mAb CHIR-12.12 restante nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 25°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por CIEX-HPLC.

A Figura 16 mostra o percentual de variantes básicas de mAb CHIR-12.12 nas formulações contendo ou NaCl ou L-arginina-HCl como o agente isotonificante quando armazenadas a 25°C por 2, 4 ou 6 meses, conforme medido por CIEX-HPLC.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

As presentes invenções serão agora descritas de forma mais completa daqui por diante, com referência aos desenhos em anexo, nos quais algumas, mas não todas, modalidades das 5 invenções são mostradas. Certamente, estas invenções podem ter modalidades de muitas formas diferentes e não devem ser interpretadas como limitadas às modalidades aqui expostas; pelo contrário, estas modalidades são fornecidas de forma que esta divulgação satisfaça exigências legais aplicáveis.

10 Muitas modificações e outras modalidades da invenção expostas aqui virão à mente daqueles habilitados na técnica à qual estas invenções pertencem possuindo o benefício dos ensinamentos apresentados nas descrições supracitadas e desenhos associados. Portanto, deve-se compreender que as 15 invenções não estão limitadas às modalidades específicas divulgadas e que modificações e outras modalidades são objetivadas para estarem inclusas dentro do escopo das reivindicações em anexo. Embora termos específicos sejam aqui empregados, eles são usados em um sentido genérico e 20 descriptivo apenas e não para propósitos de limitação.

A presente invenção está direcionada a composições farmacêuticas líquidas estáveis compreendendo pelo menos um anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação a antígeno deste como um componente terapeuticamente ou 25 profilaticamente ativo, e a métodos úteis em suas preparações. Para as finalidades da presente invenção, o termo "líquido", com relação a composições farmacêuticas ou formulações pretende incluir o termo "aquoso/a". Por 30 "componente terapeuticamente ou profilaticamente ativo", pretende-se significar que o anticorpo anti-CD40

antagonista ou fragmento de ligação a antígeno deste está tipicamente incorporado na composição para trazer uma resposta terapêutica ou profilática desejada em relação a tratamento, prevenção ou diagnóstico de uma doença ou 5 condição em um indivíduo quando a composição farmacêutica é administrada a este indivíduo.

Por "estável" pretende-se significar as composições farmacêuticas da invenção suprem a estabilidade física e/ou química do anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de 10 ligação a antígeno deste. Isto é, o anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste, essencialmente retém sua estabilidade física e/ou química e possui a atividade biológica desejada, isto é, uma ou mais das atividades antagonistas definidas aqui em outro 15 momento, incluindo, mas não limitando a: inibição de secreção de imunoglobulina por células B periféricas humanas normais estimuladas pro células T; inibição da sobrevivência e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células T de Jurkat; 20 inibição de sobrevivência e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células expressando CD40L ou ligante de CD40 solúvel (sCD40L); inibição de "sobrevivência" de sinais intracelulares anti-apoptóticos em qualquer célula estimulada por sCD40L ou 25 CD40L de fase sólida; inibição de transdução de sinal de CD40 em qualquer célula quando da ligação a sCD40L ou CD40L de fase sólida; inibição de proliferação de células B malignas; indução de deleção, anergia e/ou tolerância de células alvo portando CD40 ou células portanto ligantes 30 cognatos a CD40 incluindo, mas não limitados a, células T e

células B; indução de expansão ou ativação de células T reguladoras de CD4⁺CD25⁺ (ver, por exemplo, rejeição de tecido específica de aloantígeno de doador via interferência de CD40-CD40L, van Maurik e outros, (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404); citotoxicidade através de qualquer mecanismo (incluindo, mas não limitado a, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC), regulação para baixo de proliferação e/ou apoptose em células alvo); modulação de secreção de citocina de célula alvo e/ou expressão de molécula de sup; e combinações destes.

Métodos para monitoramento de estabilidade de proteína são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Jones (1993) *Adv. Drug Delivery Rev.* 10:29-90; Lee, ed. (1991) *Peptide and Protein Drug Delivery* (Marcel Dekker, Inc., New York, New York); e os ensaios de estabilidade divulgados aqui abaixo. Geralmente, a estabilidade de proteína é medida a uma dada temperatura para um período de tempo específico. Em modalidades preferidas, uma composição farmacêutica de anticorpo estável proporciona estabilidade do anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste quando armazenada à temperatura ambiente (cerca de 25°C) por pelo menos 1 mês, pelo menos 3 meses, ou pelo menos 6 meses, e/ou é estável a cerca de 2 a 8°C por pelo menos 6 meses, pelo menos 9 meses, pelo menos 12 meses, pelo menos 18 meses, pelo menos 24 meses.

Uma proteína como um anticorpo, quando formulada em uma composição farmacêutica, é considerada para reter sua estabilidade física a um dado ponto no tempo se não mostrar nenhum sinal visual (por exemplo, descoloração ou perda de

claridade) ou sinais mensuráveis (por exemplo, utilizando-se cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) ou dispersão de luz UV) de precipitação, agregação e/ou desnaturação naquela composição farmacêutica. Com relação a estabilidade química, uma proteína como um anticorpo, quando formulado em uma composição farmacêutica, considera-se que mantenha sua estabilidade química a um dado ponto no tempo se medições de estabilidade química são indicativas de que a proteína (isto é, anticorpo) mantém sua atividade biológica de interesse nesta composição farmacêutica. Métodos para monitorar mudanças em estabilidade química são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, métodos para detectar formas quimicamente alteradas da proteína como resultado de clipagem utilizando, por exemplo, SDS-PAGE, SEC e/ou ionização de dessorção a laser assistida por matriz/espectrometria de massa por tempo de vôo; e degradação associada a mudanças na carga molecular (por exemplo, associada a desamidação), utilizando-se, por exemplo, cromatografia de troca iônica. Ver, por exemplo, os métodos divulgados aqui abaixo.

Um anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste, quando formulado em uma composição farmacêutica, deve reter uma atividade biológica desejada em um dado ponto de tempo se a atividade biológica desejada naquele ponto de tempo está dentro de cerca de 30%, preferivelmente em cerca de 20% da atividade biológica desejada exibida no momento em que a composição farmacêutica foi preparada conforme determinado em um ensaio adequado para a atividade biológica desejada. Ensaios para medir a atividade biológica desejada do

anticorpo anti-CD40 antagonista aqui divulgado e fragmentos de ligação ao antígeno deste podem ser executados conforme descrito nos pedidos provisórios intitulados "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use", depositados em 4 de novembro de 2003, 26 de novembro de 2003 e 27 de abril de 2004, e Patentes U. S. cedidas de número 60/517.337 (procuração de número PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (procuração de número PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (procuração de número PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente; e Pedido de Patente Internacional de número PCT/US2004/037152 (procuração de número PP20107.004 (035784/282916)), também intitulada "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use" depositada em 4 de novembro de 2004 e publicada como WO 2005/044854; o conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Ver também os ensaios descritos no pedido de patente provisório intitulado "Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling", depositado em 9 de dezembro de 2005, e Pedido de Patente U.S. cedida de número 60/749.285 (procuração de número PP028035.0002 (035784/304312)), e Pedido de Patente Internacionao correspondente de número PCT/US2006/019414 (procuração de número PP028035.0003 (035784/311611)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 2006/125143; e pedido de patente provisório intitulado "Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component," depositado em 9 de dezembro de 2005, e Patente U. S. cedida de número 60/749.336

(procuração de número PP028062.0002 (035784/304311)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019325 (procuração de número PP028062.0003 (035784/311608)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 2006/125117; o conteúdo e cada uma das quais está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Ver também os ensaios descritos em Schultze e outros, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton e outros (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans e outros, (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle, (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman e outros, (1996) *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligane e outros, (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom e outros, (1993) *Immunology* 79:439-444; e Patentes U. S. de número 5.674.492 e 5.847.082, aqui incorporadas por referência.

O anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste que deve ser formulado de acordo com os métodos da presente invenção, podem ser preparados utilizando-se qualquer método conhecido na técnica, incluindo aqueles métodos divulgados em outras partes desta. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno deste, produzido de forma recombinante em uma linhagem celular CHO conforme descrito aqui abaixo.

Após sua preparação e purificação, o anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste pode ser formulado como uma composição líquida farmacêutica da maneira aqui exposta. Onde o anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste deve

ser armazenado antes de sua formulação, o mesmo pode ser congelado, por exemplo, abaixo de -20°C e então descongelado à temperatura ambiente para posterior formulação.

5 As composições farmacêuticas líquidas da invenção compreendem uma quantidade efetiva terapeuticamente ou profilaticamente do anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação a antígeno deste. A quantidade de anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno deste 10 presente da formulação leva em consideração a via de administração e volume de dosagem desejado.

Desta forma, as composições farmacêuticas líquidas da presente invenção compreendem o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-15 5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, de cerca de 0,5 mg/mL a cerca de 40,0 mg/mL, de cerca de 1,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, de cerca de 1,0 mg/mL a cerca de 30,0 mg/mL, de cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 25,0 20 mg/mL, de cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 20,0 mg/mL, de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou de cerca de 15,0 mg/mL a cerca de 25,0 mg/mL. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno 25 deste a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 5,0 mg/mL, de cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 10,0 mg/mL, de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 15,0 mg/mL, de cerca de 15,0 mg/mL a cerca de 20,0 mg/mL, de cerca de 20,0 mg/mL a cerca de 25,0 mg/mL, de cerca de 25,0 mg/mL a cerca de 30,0 30 mg/mL, de cerca de 30,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, de

cerca de 35,0 mg/mL a cerca de 40,0 mg/mL, de cerca de 40,0 mg/mL a cerca de 45,0 mg/mL, ou de cerca de 45,0 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL. Em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo anti-CD40 5 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste a uma concentração de cerca de 15,0 mg/mL, cerca de 16,0 mg/mL, cerca de 17,0 mg/mL, cerca de 18,0 mg/mL, cerca de 19,0 mg/mL, cerca de 20,0 mg/mL, cerca de 21,0 mg/mL, cerca de 22,0 mg/mL, cerca de 23,0 mg/mL, cerca de 24,0 mg/mL, cerca 10 de 25,0 mg/mL, cerca de 26,0 mg/mL, cerca de 27,0 mg/mL, cerca de 28,0 mg/mL, cerca de 29,0 mg/mL, cerca de 30,0 mg/mL, cerca de 31,0 mg/mL, cerca de 32,0 mg/mL, cerca de 33,0 mg/mL, cerca de 34,0 mg/mL, ou cerca de 35,0 mg/mL.

De acordo com a presente invenção, o anticorpo anti-15 CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 descritos aqui abaixo, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, é formulado com um tampão que mantém o pH da composição farmacêutica na faixa de cerca pH 5,0 a pH 7,0, e uma quantidade de arginina em sua forma 20 ácida, aqui chamada de arginina-HCl, suficiente para tornar a composição quase isotônica. Por "quase isotônica" pretende-se dizer que a formulação aquosa possui uma osmolalidade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360 mmol/kg, preferivelmente cerca de 240 a cerca de 340 25 mmol/kg, mais preferivelmente cerca de 250 a cerca de 330 mmol/kg, ainda mais preferivelmente de cerca de 260 a cerca de 320 mmol/kg, ainda mais preferivelmente de cerca de 270 a cerca de 310 mmol/kg. Em algumas modalidades, a composição líquida farmacêutica possui uma osmolalidade de 30 cerca de 295 mmol/kg. Métodos para determinar a

isotonicidade de uma solução são conhecidos daqueles habilitados na técnica. Ver, por exemplo, Setnikar e outros, (1959) *J. Am. Pharm. Assoc.* 48:628.

A arginina-HCl não apenas serve como um agente isotonificante, mas também serve para estabilizar o anticorpo contra mudanças de conformação, formação de agregados, fragmentação e/ou desamidação durante o armazenamento das composições farmacêuticas líquidas da invenção. Por "durante o armazenamento" pretende-se dizer que uma composição ou formulação farmacêutica líquida, uma vez preparada, não é imediatamente administrada a um indivíduo. Preferencialmente, após a preparação, a mesma é embalada para armazenamento, ou em forma líquida, em um estado congelado, ou em forma seca para posterior reconstituição em uma forma líquida ou outra forma adequada para administração a um indivíduo. Por "forma seca", pretende-se dizer que a composição ou formulação farmacêutica líquida é seca ou por liofilização (ver, por exemplo, Williams e Polli, (1984) *J. Parenteral Sci. Technol.* 35:48-59), secagem por pulverização (ver Masters, (1991) em *Spray-Drying Handbook* (5^a ed.; Longman Scientific and Technical, Essez, U.K.), págs. 491-676; e Broadhead e outros, (1992) *Drug Devel. Ind. Pharm.* 18:1169-1206; Mumenthaler e outros, (1994) *Pharm. Res.* 77:12-20; ou 25 secagem a ar (Carpenter e Crowe, (1988) *Cryobiology* 25:459-470; e Roser, (1991) *Biopharm.* 4:47-53). Mudanças de conformação, formação de agregado, fragmentação e/ou desamidação de um anticorpo durante o armazenamento de uma composição farmacêutica líquida podem afetar de forma 30 adversa a atividade biológica do anticorpo, resultando em

perda de eficácia terapêutica da composição farmacêutica. Além disso, a formação de agregado pode causar outros problemas como bloqueio de tubos, membranas ou bombas quando a composição farmacêutica contendo os anticorpos for administrada utilizando-se um sistema de infusão.

Qualquer estereoisômero (isto é, isômero L, D ou DL) de arginina ou combinações destes estereoisômeros pode estar presente nas composições farmacêuticas da invenção desde que a arginina esteja presente em sua forma ácida, isto é, arginina-HCl. Preferivelmente, o estereoisômero L é utilizado. Composições da invenção pode também ser formuladas com análogos deste aminoácido. Por "análogo de aminoácido" pretende-se um derivado do aminoácido que ocorre naturalmente e que causa o efeito desejado de tornar a composição quase isotônica, assim como reduz a formação de agregado, fragmentação e/ou desamidação do polipeptídeo durante o armazenamento das composições farmacêuticas da invenção. Análogos de arginina adequados incluem, por exemplo, aminoguanidina e N-monoetil L-arginina. Assim como com a arginina, os análogos de aminoácido são incorporados nas composições em sua forma ácida.

A concentração de arginina-HCl na composição farmacêutica dependerá da contribuição de outros componentes para a tonicidade. Em algumas modalidades, a concentração de arginina-HCl é de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, de cerca de 50 mM a cerca de 250 mM, de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, de cerca de 50 mM a cerca de 175 mM, de cerca de 50 mM a cerca de 150 mM, de cerca de 75 mM a cerca de 175 mM, de cerca de 75 mM a cerca de 150 mM, de cerca de 100 mM a cerca de 175 mM, de cerca de 100 mM a

cerca de 200 mM, de cerca de 100 mM a cerca de 150 mM, de cerca de 125 mM a cerca de 175 mM, de cerca de 125 mM a cerca de 150 mM, de cerca de 130 mM a cerca de 170 mM, de cerca de 130 mM a cerca de 160 mM, de cerca de 135 mM a cerca de 155 mM, de cerca de 140 mM a cerca de 155 mM, ou cerca 145 mM a cerca de 155 mM. Em uma tal modalidade, a concentração de arginina-HCl é de cerca de 125 mM, cerca de 150 mM ou cerca de 175 mM.

O pH de uma composição farmacêutica contendo anticorpos líquida afeta a estabilidade do anticorpo contido na mesma, principalmente através de seu efeito na formação de agregados de polipeptídeo. Assim, a quantidade de agente de tamponamento presente nas composições farmacêuticas da invenção variará dependendo do pH ideal para a estabilidade de um anticorpo anti-CD40 antagonista particular de interesse. A determinação deste pH ideal pode ser alcançada utilizando-se métodos geralmente disponíveis na técnica, incluindo, por exemplo, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), que avalia a estabilidade de conformação; SDS-PAGE e cromatografia de exclusão de tamanho (SEC-HPLC), que avalia a agregação e fragmentação; e análise de HPLC de troca catiônica (CIEX-HPLC), que avalia a degradação relacionada à troca de carga. Os pH preferidos para as composições farmacêuticas líquidas da invenção são de cerca de pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, e outros valores na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0. Em algumas modalidades, o agente de tamponamento mantém o pH da composição farmacêutica na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5, de cerca de pH

5,0 a cerca de pH 6,0, de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, de cerca de pH 5,5 a cerca de 7,0, de cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0.

Qualquer agente de tamponamento adequado que mantenha o pH da composição farmacêutica de anticorpo anti-CD40 antagonista líquida na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0 pode ser utilizado na formulação, desde que a estabilidade fisicoquímica e atividade biológica desejada do anticorpo sejam mantidas conforme observadas aqui acima.

Agentes de tamponamento adequados incluem, mas não estão limitados a, ácidos convencionais e sais destes, onde o contra-íon pode ser, por exemplo, sódio, potássio, amônio, cálcio ou magnésio. Exemplos de ácidos convencionais e sais destes que podem ser utilizados para tamponar a composição farmacêutica líquida incluem, mas não estão limitados a, tampões de ácido cítrico ou citrato, ácido succínico ou succinato, ácido acético ou acetato, ácido tartárico ou tartarato, ácido fosfórico ou fosfato, ácido glucônico ou gluconato, ácido glutâmico ou glutamato, ácido aspártico ou aspartato, ácido malélico ou maleato e ácido mállico ou malato. É reconhecido que o agente de tamponamento pode ser uma mistura do ácido e da forma de sal do ácido, por exemplo, uma mistura de ácido cítrico e citrato (aqui chamado de tampão citrato/ácido cítrico), uma mistura de ácido succínico e succinato (aqui chamado de tampão succinato/ácido succínico), uma mistura de ácido acético e acetato (aqui chamado de tampão acetato/ácido acético) e similares para cada um dos pares ácido/sal de ácido acima.

A concentração do agente de tamponamento pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, incluindo cerca de 1 mM, 2 mM, 5

mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, ou outros valores tais na faixa de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, a concentração do agente de tamponamento é de cerca de 5 mM a cerca de 15 5 mM, incluindo cerca de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, ou outros valores tais na faixa de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM.

Em algumas modalidades da invenção, a composição farmacêutica líquida compreende a concentração desejada 10 (isto é, cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL conforme observado acima) de um anticorpo anti-CD40 antagonista descrito aqui em outro momento, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, uma quantidade de arginina-HCl para 15 tornar a composição quase isotônica e um agente de tamponamento que é um tampão de ácido cítrico/citrato, onde a concentração do agente de tamponamento é tal que o agente de tamponamento mantém o pH da composição farmacêutica na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, preferivelmente 20 cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5, incluindo cerca de 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5. Por "citrato" significa um tampão compreendendo um sal do ácido cítrico. Em uma modalidade preferida, o contra-íon do citrato é o cátion sódio, e assim o componente de tampão de citrato é um citrato de 25 sódio. Entretanto, espera-se que qualquer cátion seja efetivo. Outros cátions de citrato possíveis incluem, mas não estão limitados a, potássio, amônio, cálcio e magnésio. Conforme observado acima, o tampão citrato/ácido cítrico compreende uma mistura de ácido (isto é, ácido cítrico) e a 30 forma de sal do ácido (isto é, citrato), onde o contra-íon

na forma de sal do ácido pode ser qualquer cátion adequado. Em uma determinada modalidade, o contra-íon para a forma de sal do ácido é o cátion sódio, e assim o agente de tamponamento compreende uma mistura de ácido cítrico e citrato de sódio. Conforme observado acima, a concentração do tampão citrato/ácido cítrico pode ser de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, incluindo cerca de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 8 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, ou outros valores tais na faixa de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM. Em algumas modalidades, a concentração do tampão citrato/ácido cítrico é de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, incluindo cerca de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM ou cerca de 15 mM.

Em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista, como o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 20,0 mg/mL; uma quantidade de arginina-HCl para tornar a composição quase isotônica; e o agente de tamponamento é um tampão de citrato/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, preferivelmente cerca de 10 mM. Ainda em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista como o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação ao antígeno destes, em uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, cerca de 5,0 mg/mL a cerca de

35,0 mg/mL, cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 20,0 mg/mL; uma quantidade de arginina-HCl para tornar a composição quase isotônica; e o agente de tamponamento sendo um tampão citrato/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 20 mM, cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, preferivelmente cerca de 10 mM.

Em algumas modalidades preferidas, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes; um agente de tamponamento para manter o pH da composição farmacêutica na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0; e a concentração de arginina-HCl é de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM. Em algumas destas modalidades, o agente de tamponamento é um tampão de citrato/ácido cítrico e uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, e a composição farmacêutica possui um pH de cerca de 5,0 a cerca de pH 7,0, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0. Em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL incluindo cerca de 10,0 mg/mL, cerca de 15,0 mg/mL, cerca

de 20,0 mg/mL, cerca de 25,0 mg/mL, cerca de 30,0 mg/mL ou cerca de 35,0 mg/mL; cerca de 150 mM de arginina-HCl; e o agente de tamponamento é de cerca de 10 mM de tampão de citrato de sódio/ácido cítrico; onde a formulação possui um pH de cerca de pH 5,5.

A degradação da proteína devido ao congelamento/descongelamento ou cisalhamento mecânico durante o processamento de formulações farmacêuticas líquidas da presente invenção pode ser inibida incorporando-se tensoativos na formulação a fim de baixar a tensão superficial na interface solução-ar. Assim, em algumas modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes; um agente de tamponamento para manter o pH da composição farmacêutica na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0; uma quantidade de arginina-HCl para tornar a composição farmacêutica líquida quase isotônica; e ainda compreende um tensoativo. Em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes; um agente de tamponamento para manter o pH da composição farmacêutica na faixa de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0; arginina-HCl e uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, ou cerca de 100 mM a cerca de 2300 mM; e ainda compreende um tensoativo.

Tensoativos típicos empregados são tensoativos não iônicos, incluindo ésteres de polioxietileno sorbitol como

polisorbato 80 (Tween 80) e polisorbato 20 (Tween 20); ésteres de polioxipropileno-polioxietileno como Pluronic F68; álcoois de polioxietileno como Brij 35; simeticona; polietileno glicol como PEG400; lisofosfatidilcolina; e 5 polioxietileno-p-t-octilfenol como Triton X-100. Estabilização clássica de farmacêuticos por tensoativos ou emulsificantes é descrita, por exemplo, em Levine e outros, (1991) *J. Parenteral Sci. Technol.* 45(3): 160-165, aqui incorporada para referência. Um tensoativo preferido 10 empregado na prática da presente invenção é o polisorbato 20 ou polisorbato 80. Onde um tensoativo é incluído, é tipicamente adicionado em uma quantidade de cerca de 0.001 % a cerca de 1.0%, de cerca de 0.001% a cerca de 0.5%, de cerca de 0.001% a cerca de 0.4%, de cerca de 0.001% a cerca 15 de 0.3%, de cerca de 0.001% a cerca de 0.2%, de cerca de 0.005% a cerca de 0.5%, de cerca de 0.005% a cerca de 0.2%, de cerca de 0.01% a cerca de 0.5%, de cerca de 0.01% a cerca de 0.2%, de cerca de 0.03% a cerca de 0.5%, de cerca de 0.03% a cerca de 0.3%, de cerca de 0.05% a cerca de 20 0.5%, ou de cerca de 0.05% a cerca de 0.2%, onde os percentuais estão em uma base de peso/volume (p/v).

Assim, em algumas modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 25 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes; o agente de tamponamento é um tampão de citrato/ácido cítrico, por exemplo, um tampão de citrato de sódio/ácido cítrico, e uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, cerca de 5 mM a cerca de 25 mM, ou cerca de 5 mM a 30 cerca de 15 mM; a composição possui um pH de cerca de pH

5,0 a cerca de 7,0 pH, cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5, ou cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0; arginina-HCl está presente a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, cerca de 100 mM a cerca de 200 mM, ou cerca de 50 mM a cerca de 150 mM; e a composição farmacêutica compreende ainda um tensoativo, por exemplo, polisorbato 20, em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (p/v) ou cerca de 0,001% a cerca de 0,5% (p/v). Em outras modalidades, a composição farmacêutica líquida compreende o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, de cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, incluindo de cerca de 10,0 mg/mL, de cerca de 15,0 mg/mL, de cerca de 20,0 mg/mL, de cerca de 25,0 mg/mL, de cerca de 30,0 mg/mL, ou de cerca de 35,0 mg/mL; cerca de 50 mM a cerca de 200 mM de arginina-HCl, incluindo cerca de 150 mM de arginina-HCl; o agente de tamponamento é citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, incluindo cerca de 10 mM; e a composição farmacêutica opcionalmente compreende um tensoativo, por exemplo, polisorbato 20, em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (p/v), incluindo cerca de 0,001% a cerca de 0,5% (p/v), cerca de 0,01% a cerca de 0,25% (p/v), cerca de 0,1% a cerca de 0,25% a cerca de 0,2% (p/v), cerca de 0,05% a cerca de 0,2% (p/v); onde a composição farmacêutica possui um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, de cerca de

pH 5,5 a cerca de pH 6,5, de cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0, ou cerca de pH 5,5.

A composição farmacêutica líquida pode estar essencialmente livre de quaisquer conservantes e outros veículos, excipientes ou estabilizantes. Alternativamente, a composição farmacêutica pode, opcionalmente, incluir um ou mais conservantes, por exemplo, agentes antibacterianos, veículos farmaceuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes aqui descritos, contanto que não afetem de forma adversa a estabilidade fisicoquímica do anticorpo anti-CD40 ou fragmento de ligação ao antígeno deste. Exemplos de veículos, excipientes e estabilizantes aceitáveis incluem, mas não estão limitados a, agentes de tamponamento adicionais, co-solventes, tensoativos, antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina, agentes quelantes como ADTA, complexos metálicos (por exemplo, complexo Zn-proteína) e polímeros biodegradáveis como poliésteres. Uma discussão completa de formulação e seleção de veículos, estabilizantes e isomólitos farmaceuticamente aceitáveis podem ser encontrados em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (18^a ed.; Mack Publishing Company, Eaton, Pennsylvania, 1990), aqui incorporado por referência.

Assim, em uma modalidade, as composições farmacêuticas líquidas de anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção compreendem ainda o aminoácido metionina para inibir a oxidação de resíduos de aminoácidos oxidáveis nas cadeias de anticorpo de polipeptídeo. Por "inibir" refere-se a mínimo acúmulo de espécies oxidáveis ao longo do tempo. Inibir a oxidação resulta em maior retenção do anticorpo

anti-CD40 antagonista em sua forma molecular apropriada. Qualquer estereoisômero de metionina (isômero L, D ou DL) ou combinações destes podem ser utilizados. A quantidade a ser adicionada deve ser uma quantidade suficiente para 5 inibir a oxidação dos resíduos de aminoácidos oxidáveis de forma que a quantidade de espécies oxidáveis seja aceitável para agências reguladoras. Tipicamente, isto significa que a composição contém não mais que cerca de 10% a cerca de 30% de produtos de oxidação. Geralmente, isto pode ser 10 atingido adicionando-se metionina de forma que a razão entre metionina adicionada e resíduos de metionina variem de cerca de 1:1 a cerca de 1.000:1, mais preferivelmente 10:1 a cerca de 100:1.

A quantidade preferida de metionina a ser adicionada 15 pode ser prontamente determinada empiricamente preparando a composição compreendendo o anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse, ou fragmento de ligação ao antígeno deste com diferentes concentrações de metionina e determinando o efeito relativo na formação de espécies oxidativas do 20 polipeptídeo utilizando, por exemplo, separação cromatográfica da espécie molecular e identificação utilizando-se padrões de peso molecular de polipeptídeo, de forma que com RP-HPLC, ou cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) conforme descrito abaixo no Exemplo 1. 25 Esta concentração de metionina que maximiza a inibição de oxidação de resíduos de aminoácidos oxidáveis, sem possuir efeitos adversos na inibição relacionada a aminoácido de agregação de anticorpo representaria uma quantidade preferida de metionina a ser adicionada à composição para 30 adicionalmente melhorar a estabilidade do anticorpo.

Assim, em algumas modalidades da invenção, a composição farmacêutica líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação ao antígeno destes; o agente de tamponamento é um tampão de citrato/ácido cítrico, por exemplo, um tampão de citrato de sódio/ácido cítrico, a uma concentração de cerca de 1 mM a cerca de 50 mM, de cerca de 5 mM a cerca de 25 mM, ou de cerca de 5 mM a cerca de 15 mM; a composição farmacêutica 5 possui um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,5, ou de cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0; a arginina-HCl está presente em uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM, de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM, ou de cerca de 50 mM a cerca de 150 mM; um tensoativo está presente, por exemplo, polisorbato 20 ou polisorbato 80, em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (p/v) ou de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% (p/v); e a composição farmacêutica compreende ainda metionina a uma concentração de cerca de 0,5 mM a cerca de 20,0 mM, de cerca de 0,5 mM a cerca de 10,0 mM, de cerca de 1,0 mM a cerca de 20,0 mM, de cerca de 1,0 mM a cerca de 10,0 mM, de cerca de 1,0 mM a cerca de 7,0 mM, de cerca de 2,0 mM a cerca de 6,0 mM, ou de cerca de 2,5 mM a cerca de 5,0 mM. Em outras modalidades, a composição farmacêutica 10 líquida compreende um anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação ao antígeno destes, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, de cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, incluindo de cerca de 10,0 mg/mL, de 15 20 25 30

cerca de 15,0 mg/mL, de cerca de 20,0 mg/mL, de cerca de 25,0 mg/mL, de cerca de 30,0 mg/mL, ou cerca de 35,0 mg/mL; de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM de arginina-HCl, incluindo cerca de 150 mM de arginina-HCl; tampão de 5 citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, incluindo cerca de 10 mM; opcionalmente um tensoativo, por exemplo, polisorbato 20, em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (p/v), incluindo de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% (p/v), de cerca de 0,01% a cerca de 0,25% (p/v), de cerca de 10 0,025% a cerca de 0,2% (p/v), de cerca de 0,025% a cerca de 0,1% (w/v), ou de cerca de 0,05% a cerca de 0,2% (w/v); e, opcionalmente, metionina, por exemplo, a uma concentração de cerca de 0,5 mM a cerca de 10,0 mM, de cerca de 1,0 mM a 15 cerca de 7,0 mM, de cerca de 2,0 mM a cerca de 6,0 mM, ou de cerca de 2,5 mM a cerca de 5,0 mM, incluindo cerca de 2,0 mM, cerca de 2,5 mM, cerca de 3,0 mM, cerca de 3,5 mM, cerca de 4,0 mM, cerca de 4,5 mM, cerca de 5,0 mM, ou cerca de 5,5 mM; onde a composição farmacêutica líquida possui um pH de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 7,0, de cerca de pH 5,0 20 qa cerca de pH 6,0, de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 5,5, de cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,5, de cerca de pH 5,5 a cerca de pH 6,0, ou cerca de pH 5,5.

Ainda em outra modalidade, a composição farmacêutica 25 líquida compreende o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50,0 mg/mL, de cerca de 5,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, ou de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35,0 mg/mL, incluindo de cerca de 30 10,0 mg/mL, de cerca de 15,0 mg/mL, de cerca de 20,0 mg/mL,

de cerca de 25,0 mg/mL, de cerca de 30,0 mg/mL, ou cerca de 35,0 mg/mL; de cerca de 100 mM a cerca de 200 mM de arginina-HCl, incluindo cerca de 150 mM de arginina-HCl; tampão de citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração 5 de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, incluindo cerca de 10 mM; opcionalmente um tensoativo, por exemplo, polisorbato 20, em uma quantidade de cerca de 0,025% a cerca de 0,1% (p/v); e, opcionalmente, uma metionina, por exemplo, a uma concentração de cerca de 2,0 mM a cerca de 5,5 mM, 10 incluindo cerca de 5,0 mM; onde a composição farmacêutica líquida possui um pH of de cerca de pH 5,0 a cerca de pH 6,0, incluindo cerca de pH 5,5.

Adicionalmente àqueles agentes divulgados acima, outros agentes estabilizantes, como albumina, ácido 15 etilenodiaminotetracético (EDTA), podem ser opcionalmente adicionados para melhorar adicionalmente a estabilidade das composições farmacêuticas líquidas. Onde desejável, a quantidade de albumina pode ser adicionada a concentrações de cerca de 1,0% p/v ou menos. O EDTA age como um limpador 20 de íons metálicos conhecidos por catalisarem muitas reações de oxidação, fornecendo assim um agente estabilizante adicional. Quando desejável, a quantidade de EDTA pode ser adicionada a concentrações de cerca de 0,1 a cerca de 5,0 mM.

Quando desejável, açúcares ou álcoois de açúcar podem 25 ser também incluídos nas composições farmacêuticas incluindo anticorpo anti-CD40 antagonista líquidas da presente invenção. Qualquer açúcar como mono-, di- ou polissacarídios, ou glucanos solúveis em água, incluindo, 30 por exemplo, frutose, glicose, manose, sorbose, xilose,

maltose, lactose, sacarose, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, amido solúvel, amido de hidroxietil e carboximetilcelulose-Na podem ser utilizados. A sacarose é o aditivo de açúcar mais preferido. O álcool de açúcar é definido como um hidrocarboneto de C₄ a C₈ possuindo um grupo -OH e inclui, por exemplo, manitol, sorbitol, inositol, galacititol, dulcitol, xilitol e arabitol com manitol sendo o álcool de açúcar aditivo mais preferido. Os açúcares ou álcoois de açúcar mencionados acima podem ser utilizados individualmente ou em combinação. Não há limite fixo para a quantidade utilizada, desde que o açúcar ou álcool de açúcar seja solúvel na preparação líquida e não afete de forma adversa os efeitos estabilizantes utilizando os métodos da invenção. Preferivelmente, a concentração de açúcar ou álcool de açúcar está entre cerca de 1,0% e cerca de 15,0% (p/v), mais preferivelmente entre cerca de 2,0% e cerca de 10,0% (p/v).

Após a composição farmacêutica líquida descrita aqui ser preparada, ela pode ser liofilizada para evitar degradação. Métodos para liofilizar composições líquidas são conhecidos àqueles com habilidades comuns na técnica. Imediatamente antes do uso, a composição pode ser reconstituída com um diluente estéril (solução de Ringer, água destilada ou solução salina estéril, por exemplo) que pode incluir ingredientes adicionais. Durante a reconstituição, a composição é preferivelmente administrada a indivíduos utilizando aqueles métodos que são conhecidos àqueles habilitados na técnica.

As composições farmacêuticas líquidas contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção são estáveis e

assim possuem estabilidade de armazenamento aumentada em relação a composições de anticorpo anti-CD40 antagonista preparadas em soluções tamponadas compreendendo cloreto de sódio como agente isotonificante. Sem estar limitado pela teoria, acredita-se que esta estabilidade de armazenamento aumentada é observada na formulação líquida, se armazenada diretamente nesta forma para posterior uso, armazenada em um estado congelado e descongelada antes do uso ou preparada em uma forma seca, como liofilizada, seca a ar ou seca por pulverização, para posterior reconstituição em uma forma líquida ou outra forma antes do uso. Preferivelmente, composições da invenção são armazenadas diretamente em sua forma líquida para obterem vantagem completa da conveniência de possuir estabilidade em armazenamento aumentada na forma líquida, facilidade de administração sem reconstituição e capacidade de suprir a formulação em seringas pré-preenchidas, prontas para uso ou como preparações de multidose se a formulação for compatível com agentes bacterioestáticos.

As composições da invenção relacionam-se à descoberta que o uso de arginina-HCl como um agente isotonificante e uma mistura de um ácido e sua forma de sal, como citrato de sódio/ácido cítrico, como o agente de tamponamento, resultam em uma composição farmacêutica líquida contendo anticorpo anti-CD40 antagonista que possui estabilidade de armazenamento aumentada com relação a uma composição farmacêutica líquida de anticorpo anti-CD40 antagonista preparada com cloreto de sódio seu respectivo agente de tamponamento. A estabilidade de armazenamento aumentada da composição é alcançada através da influência da forma ácida

de arginina na estabilidade do anticorpo anti-CD40 antagonista terapeuticamente ativo, mais particularmente sua influência na agregação de polipeptídeo, fragmentação e desamidação durante o armazenamento em formulações líquidas. Além disso, a incorporação de arginina-HCl como um agente isotonificante em uma composição de anticorpo anti-CD40 antagonista líquida tamponada da maneira aqui exposta resulta em composições farmacêuticas líquidas que são quase isotônicas sem incluírem agentes isotonificantes adicionais, como cloreto de sódio.

A forma ácida de arginina incorporada nas composições farmacêuticas líquidas estáveis da invenção protege o anticorpo anti-CD40 antagonista terapeuticamente ativo ou fragmento de ligação ao antígeno deste contra mudanças físicas e químicas, aumentando assim a estabilidade do anticorpo durante o armazenamento da composição. Por "aumento de estabilidade" indica-se que uma ou mais entre formação de agregado, fragmentação e desamidação pelo anticorpo durante o armazenamento da composição farmacêutica líquida são reduzidas com relação ao que é observado durante o armazenamento de uma composição farmacêutica líquida compreendendo o anticorpo anti-CD40 antagonista e os mesmos componentes de formulação com exceção da ausência deste isotonificante e estabilizante em particular. O efeito de arginina-HCl na agregação de anticorpo anti-CD40 antagonista durante o armazenamento em uma composição líquida pode ser prontamente determinado medindo-se a mudança no anticorpo anti-CD40 solúvel em solução ao longo do tempo. A quantidade de anticorpo anti-CD40 solúvel em solução pode ser quantificada por um número

de ensaios analíticos adaptados para detecção do anticorpo de interesse. Tais ensaios incluem, por exemplo, HPLC de fase reversa (RP), HPLC de exclusão de tamanho (SEC) e absorbância UV. A agregação pode ser também monitorada utilizando-se SDS-PAGE. Ver também os Exemplos abaixo.

No caso de agregação, uma quantidade efetiva de arginina-HCl para incorporar em uma composição farmacêutica líquida contendo anticorpo anti-CD40 antagonista para se obter as composições farmacêuticas estáveis da invenção seria vista como uma quantidade que resultasse em redução da formação de agregado ao longo do tempo, e assim maior retenção de anticorpo anti-CD40 antagonista solúvel na solução em sua forma molecular não agregada biologicamente ativa. Desta forma, por exemplo, onde o anticorpo anti-CD40 antagonista é o anticorpo anti-CD40 monoclonal CHIR-12.12 descrito nos Exemplos abaixo, uma quantidade efetiva de arginina-HCl para uso na preparação de uma composição estável da invenção seria uma quantidade que resultasse em maior retenção do anticorpo CHIR-12.12 em sua forma molecular monomérica.

Sem estar limitado pela teoria, estabilidade de armazenamento aumentada das composições contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção pode ser também associadas a efeitos inibidores de arginina-HCl em fragmentação de anticorpo e/ou desamidação de glutamina e/ou resíduos de aspargina no anticorpo terapeuticamente ativo durante o armazenamento. O efeito de arginina-HCl em fragmentação de anticorpo pode prontamente determinar, por monitoramento das mudanças na espécie molecular na formulação ao longo do tempo, por exemplo, utilizando-se

análise por SDS-PAGE e/ou SEX-HPLC; ver Exemplos aqui abaixo. O efeito de arginina-HCl na desamidação do polipeptídeo do anticorpo anti-CD40 durante o armazenamento em uma composição líquida pode ser prontamente determinado 5 monitorando-se a quantidade de anticorpo anti-CD40 antagonista presente em sua forma desamidada ao longo do tempo. Métodos para medição de espécie molecular, isto é, nativa ou desamidada, de um polipeptídeo presente na fase de solução, são geralmente conhecidos na técnica. Tais 10 métodos incluem separação cromatográfica da espécie molecular e identificação utilizando padrões de peso molecular de polipeptídeo, como através de RP-HPLC ou cromatografia de troca catiônica (CIEX-HPLC) conforme aqui descrito nos Exemplos abaixo.

15 As composições farmacêuticas líquidas contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção podem conter outros compostos que aumentam a efetividade ou promovem as qualidades desejáveis no anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse que serve como componente terapeuticamente ativo 20 desde que a principal efeito estabilizante atingido com a arginina-HCl não seja afetado de forma adversa. A composição deve ser segura para administração através da via escolhida, deve ser estéril e deve reter sua atividade terapêutica desejada.

25 As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser preparadas, por exemplo, pela pré-mistura de agente estabilizantes e tamponantes, e quaisquer outros excipientes, antes da incorporação do anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse. Quaisquer excipientes adicionais 30 que possam ser adicionados para estabilizar adicionalmente

as composições da presente invenção não devem afetar de forma adversa os efeitos estabilizantes do agente isotonificante e estabilizante principal, isto é, arginina-HCl, adicionalmente em combinação com o agente de tamponamento, conforme utilizado para se obter as novas composições aqui divulgadas. Após a adição da arginina-HCl para atingir a quase isotonicidade e estabilidade aumentada do anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse, o pH da composição líquida é ajustado utilizando-se o agente de tamponamento, preferivelmente em uma faixa aqui divulgada, mais preferivelmente ao pH ideal para o anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse, por exemplo, um pH entre cerca de pH 5,0 e pH 7,0, preferivelmente de cerca de pH 5,5, para o anticorpo monoclonal CHIR-12.12. Embora o pH possa ser ajustado após a adição do anticorpo anti-CD40 antagonista à composição, preferivelmente o mesmo é ajustado antes da adição deste polipeptídeo, uma vez que isto pode reduzir o risco de desnaturação do polipeptídeo. Dispositivos mecânicos apropriados são então utilizados para se atingir uma mistura apropriada de constituintes.

Assim, a presente invenção fornece um método para aumentar a estabilidade de um anticorpo anti-CD40 antagonista, ou fragmento de ligação ao antígeno deste, em uma composição farmacêutica. O método compreende combinar o anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação ao antígeno deste com um agente de tamponamento que mantenha o pH da composição farmacêutica a um pH entre cerca de pH 5,0 e pH 7,0 e uma quantidade de arginina-HCl suficiente para tornar a composição líquida quase isotônica. Em algumas modalidades, o agente de tamponamento é um tampão de

citrato/ácido cítrico, a concentração do agente de tamponamento é de cerca de 5 mM a cerca de 50 mM, e a quantidade de arginina-HCl possibilita uma concentração deste agente isotonificante na composição de cerca de 50 mM a cerca de 300 mM de arginina-HCl. Em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 antagonista é o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação ao antígeno destes; o agente de tamponamento é cerca de 5 mM a cerca de 25 mM de tampão de citrato de sódio/ácido cítrico; a concentração de arginina-HCl na composição é de cerca de 150 mM, e a composição possui um pH de cerca de 5,0, cerca de 5,5, cerca de 6,0 ou cerca de 6,5.

A composição farmacêutica líquida estabilizada compreendendo o anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse, por exemplo, um anticorpo anti-CD40 antagonista como o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, deveria ser formulada em uma forma de dosagem e pode ser em uma forma injetável ou de infusão como uma solução, suspensão ou emulsão. Conforme observado anteriormente, ela pode ser armazenada congelada ou preparada sob a forma seca, como um pó liofilizado, que pode ser reconstituído em uma solução líquida, suspensão, ou emulsão antes da administração por qualquer um dos vários métodos incluindo vias oral ou parenteral de administração. Preferivelmente, a mesma é armazenada na formulação líquida para obter a vantagem da estabilidade de armazenamento aumentada atingida de acordo com os métodos da presente invenção conforme descrito abaixo. A composição farmacêutica estabilizada é preferivelmente esterilizada por filtração por membrana e é

armazenada em recipientes de dose unitária ou dose múltipla, como frascos ou ampolas seladas. Métodos adicionais para a formulação de uma composição farmacêutica geralmente conhecidos na técnica podem ser utilizados para 5 adicionalmente melhorar a estabilidade em armazenamento das composições farmacêuticas líquidas aqui divulgadas desde que estes não afetem de forma adversa os efeitos benéficos dos agentes de estabilização e tamponamento preferidos divulgados e descritos aqui acima. Uma discussão completa 10 de formulação e seleção de veículos, estabilizantes, farmaceuticamente aceitáveis, etc. pode ser encontrada em *Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) (18^a ed.; Mack Pub. Co., Eaton, Pennsylvania), aqui incorporada por referência.

15 Desta maneira, a presente invenção fornece um artigo de produção compreendendo um recipiente contendo uma composição farmacêutica contendo anticorpo anti-CD40 antagonista líquida estável da invenção, e opcionalmente compreendendo instruções para seu uso. Recipientes 20 adequados incluem, por exemplo, frascos, garrafas e seringas. O recipiente pode ser formado de uma variedade de materiais como plástico ou vidro. EM uma modalidade, o recipiente é um frasco de vidro de uso único de 3 a 50 cm³. Alternativamente, para uma formulação pronta para uso, o 25 recipiente pode ser, por exemplo, um frasco de vidro de 3 a 100 cm³. O recipiente retém a formulação e a etiqueta no ou associada ao recipiente pode indicar instruções para uso. O artigo de fabricação pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial ou do usuário, 30 incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas,

seringas e suplementos na embalagem com instruções de utilização.

Anticorpos Anti-CD40 nas Compoſições Farmacêuticas da Invenção

As compoſições farmacêuticas da presente invenção compreendem anticorpos anti-CD40, particularmente anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmentos de ligação ao antígeno destes que têm como alvo o receptor CD40 e que modulam ADCC, interferem com a sinalização de CD40, particularmente caminhos de sinalização de CD40 que são mediados por interação de CD40 com o ligante de CD40 (CD40L), ou ambos. Por "antígeno CD40", "antígeno de superfície celular de CD40", "receptor CD40" ou "CD40" diz-se de uma glicoproteína transmembrana que pertence à família de receptor de fator de necrose de tumor (TNF) (ver, por exemplo, Patentes U. S. de número 5.674.492 e 4.708.871; Stamenkovic e outros, (1989) EMBO 8:1403; Clark, (1990) *Tissue Antigens* 36:33; Barclay e outros, 1997) *The Leucocyte Antigen Facts Book* (2^a ed.; Academic Press, San Diego)). Foram identificadas duas isoformas de CD40 humano, codificadas por variantes transcritas alternativamente unidas deste gene. A primeira isoforma (também conhecida como "isoforma longa" ou "isoforma 1") é expressa como um polipeptídeo precursor de aminoácido 277 (Id. de Seq. nº 12 (primeiramente relatado como Acessão GenBank número CAA43045, e identificado como isoforma 1 em Acessão GenBank número NP_001241), codificada por Id. de Seq. nº 11 (ver Acessões GenBank número X60592 e NM_001250)), que possuem uma seqüência de sinal representada pelos primeiros 19 resíduos. A segunda isoforma (também conhecida como

"isoforma curta" ou "isoforma 2") é expressa como um polipeptídeo precursor de aminoácido 203 (Id. de Seq. n° 10 (Acesso GenBank número NP_690593), codificada pela Id. de Seq. n° 9 (Acesso GenBank número NM_152854)), que também 5 possui uma seqüência de sinal representada pelos primeiros 19 resíduos. Os polipeptídeos precursores destas duas isoformas de CD40 humano compartilham em comum seus primeiros 165 resíduos (isto é, resíduos 1 a 165 da Id. de Seq. n° 10 e Id. de Seq. N°: 12). O polipeptídeo precursor 10 da isoforma curta (mostrada na Id. de Seq. n° 10) é codificado por uma variante transcrita (Id. de Seq. n° 9) a qual falta um segmento de codificação, que leva a um deslocamento de quadro de tradução; a isoforma de CD40 resultante contém um terminação C mais curto e distinto 15 (resíduos 166 a 203 de Id. de Seq. n° 10) daquele contido na isoforma longa de CD40 (terminação C mostrada nos resíduos 166 a 277 de Id. de Seq. n° 12). Para as finalidades da presente invenção, o termo "antígeno CD40", 20 "antígeno de superfície celular CD40", "receptor CD40" ou "CD40" englobam tanto a isoforma curta quanto a longa de CD40.

O antígeno CD40 é exibido na superfície de uma variedade de tipos de célula, conforme aqui descrito. Por "exibido na superfície" e "expresso na superfície" diz-se 25 que todo ou uma porção do antígeno CD40 está exposto no exterior da célula. O antígeno CD40 exibido ou expresso pode ser total ou parcialmente glicosilado.

Por "atividade agonista" diz-se que uma substância funciona como um agonista. Um agonista combina com um 30 receptor ou uma célula e inicia uma reação ou atividade que

é similar a ou a mesma que aquela iniciada pelo ligante natural do receptor. Um agonista de CD40 induz qualquer uma ou todas, mas não limitado às seguintes respostas: proliferação e diferenciação de célula B, produção de 5 anticorpo, adesão intercelular, geração de memória de célula B, mudança de isótipo, regulação para cima de expressão de superfície celular de MHC Classe II e CD80/86, e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-12 e TNF. Por "atividade antagonista" diz-se que a substância 10 funciona como um antagonista. Um antagonista de CD40 previne ou reduz a indução de qualquer resposta induzida pela ligação do receptor de CD40 a um ligante agonista, particularmente CD40L. O antagonista pode reduzir a indução de qualquer uma ou mais das respostas a agonista ligando 15 por 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, preferivelmente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, mais preferivelmente 70%, 80%, 85%, e mais preferivelmente 90%, 95%, 99% ou 100%. Métodos para medir a especificidade de ligação do ligante de CD40 e 20 atividade antagonista de um agente terapêutico de anti-CD40, por exemplo, um anticorpo anti-CD40, são conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, ensaios de ligação competitiva padrão, ensaios para monitoramento de secreção de imunoglobulina por células B, ensaios de proliferação de células B, ensaios de proliferação de 25 célula B tipo Banchereau, ensaios de ajudantes de célula T para produção de anticorpo, ensaios de co-estímulo de proliferação de célula B e ensaios para regulação para cima de marcadores de ativação de célula B. Ver, por exemplo, tais ensaios em WO 00/75348 e Patente U. S. de número 30 6.087.329, aqui incorporados por referência. Ver também

pedidos provisórios intitulados "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use", depositado me 4 de novembro de 2003, 26 de novembrod e 2003 e 27 de abril de 2004 e Pedidos de Patente U. S. cedidos de 5 número 60/517.337 (procuração de número PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (procuração de número PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (procuração de número PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, e Pedido de Patente Internacional de número PCT/US2004/037152 10 (procuração de número PP20107.004 (035784/282916)), também intitulada "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use" depositada em 4 de novembro de 2004 e publicada como WO 2005/044854; o conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência em sua 15 totalidade.

Por atividade agonista "significativa" diz-se de uma atividade agonista de pelo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% superior à atividade agonista induzida por uma substância neutra ou 20 controle negativo conforme medido em um ensaio de uma resposta de célula B. Preferivelmente, atividade agonista "significativa" é uma atividade agonista que é pelo menos duas vezes superior ou pelo menos 3 vezes superior à atividade agonista induzida por uma substância neutra ou 25 controle negativo conforme medido em um ensaio de resposta de célula B. Assim, por exemplo, onde a resposta de célula B de interesse é proliferação de célula B, atividade agonista "significativa" seria a indução de um nível de proliferação de célula B que fosse pelo menos 2 vezes 30 superior ou pelo menos 3 vezes superior ao nível de

proliferação de célula B induzido por uma substância neutra ou controle negativo. EM uma modalidade, uma imunoglobulina não específica, por exemplo, IgG1, que não se liga a CD40, serve como o controle negativo. Uma substância "livre de atividade agonista significativa" exibiria uma atividade agonista de não mais que cerca de 25% superior que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou controle negativo, preferivelmente não mais que cerca de 20% superior, 15% superior, 10% superior, 5% superior, 1% superior, 0,5% superior ou mesmo não mais de 0,1% superior que a atividade agonista induzida por uma substância neutra ou controle negativo conforme medido em um ensaio de uma resposta de célula B.

Em algumas modalidades da invenção, as composições farmacêuticas líquidas estáveis da invenção compreendem um anticorpo anti-CD40 antagonista. Tais anticorpos são livres de atividade agonista significativa conforme observado acima quando ligados a um antígeno CD40 em uma célula humana. Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista está livre de atividade agonista significativa em uma resposta celular. Em uma outra modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista está livre de atividade agonista significativa em ensaios de mais de uma resposta celular (por exemplo, proliferação e diferenciação, ou proliferação, diferenciação e, para células B, produção de anticorpo). Em algumas modalidades da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista é, por exemplo, o anticorpo monoclonal totalmente humano CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, conforme observado aqui abaixo.

Qualquer um dos ensaios conhecidos na técnica pode ser utilizado para determinar se um anticorpo anti-CD40 atua como um antagonista de uma ou mais respostas de célula B. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 atua como um 5 antagonista de pelo menos uma resposta de célula B, selecionada a partir de um grupo consistindo de proliferação de célula B, diferenciação de célula B, produção de anticorpo, adesão intercelular, geração de memória de célula B, mudança de isótipo, regulação para 10 cima de expressão de superfície celular de MHC Classe II e CD80/86, e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-8, IL-12 e TNF. De particular interesse são os anticorpos anti-CD40 antagonistas que livram de atividade agonista significativa com relação à proliferação de célula B quando 15 ligadas ao antígeno CD40 humano na superfície de uma célula B humana.

Em tal modalidade, o anticorpo anti-CD40 é um antagonista de proliferação de célula B conforme medido em um ensaio de proliferação de célula B como aquele descrito 20 no Exemplo 4 aqui abaixo, e o anticorpo anti-CD40 antagonista estimula a proliferação de célula B em um nível que não é de mais de cerca de 25% superior que a proliferação de célula B induzida por um agente neutro ou controle negativo, preferivelmente não mais que cerca de 25 20% superior, 15% superior, 10% superior, 5% superior, 1% superior, 0,5% superior ou mesmo não mais de cerca de 0,1% superior que a proliferação de célula B induzida por uma substância neutra ou controle negativo.

Em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 é um 30 antagonista de proliferação de célula B que é induzido por

outro anticorpo anti-CD40, por exemplo, o anticorpo anti-CD40 S2C6, conforme medido em um ensaio de proliferação de célula B tal como aquele descrito no Exemplo 4 aqui abaixo, e o nível de proliferação de célula B estimulado pelo outro 5 anticorpo anti-CD40 na presente do antagonista anticorpo anti-CD40 não é de mais que cerca de 25% da proliferação de célula B induzida pelo outro anticorpo anti-CD40 na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (isto é, pelo menos 75% de inibição), preferivelmente não mais que cerca 10 de 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% ou mesmo não mais que cerca de 0,1% de proliferação de célula B induzida pelo outro anticorpo anti-CD40 na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista.

Ainda em outras modalidades, o anticorpo anti-CD40 é 15 um antagonista de proliferação de célula B que é induzido pela linha celular EL4B5 conforme medido no ensaio de ativação de célula B descrito no Exemplo 4 aqui abaixo e o nível de proliferação de célula B estimulado pela linha celular EL4B5 na presença do anticorpo anti-CD40 20 antagonista não é superior que cerca de 25% da proliferação de célula B induzida por esta linha celular na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (isto é, pelo menos 75% de inibição), preferivelmente não mais que cerca de 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% ou mesmo não mais que cerca de 0,1% de 25 proliferação de célula B induzida por esta linha celular na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista.

Ainda em outra modalidade, o anticorpo anti-CD40 é um 30 antagonista de produção de anticorpo induzida por célula T por células B humanas conforme medido no ensaio de ajudante de célula T humana para produção de anticorpo por células B

descritas no Exemplo 4 aqui abaixo. Desta maneira, o nível de produção de anticorpo IgG, produção de anticorpo IgM ou a produção de ambos os anticorpos IgG e IgM pelas células B estimuladas pelas células T na presença do anticorpo anti-CD40 antagonista não é mais que cerca de 50% da produção de anticorpo respectiva por células B estimuladas por células T na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista (isto é, pelo menos 75% de inibição), preferivelmente não mais que cerca de 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% ou mesmo não mais que cerca de 0,1% da respectiva produção de anticorpo por células B estimuladas por células T na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista.

Por "ligante de CD40" diz-se de qualquer peptídeo, polipeptídeo ou proteína que possa se ligar a e ativar um ou mais caminhos de sinalização de CD40. Assim, "ligantes CD40" incluem, mas não estão limitados a, proteínas ligantes a CD40 de comprimento total e variantes e fragmentos destas que retenham atividade suficiente para executar a função de ligação a e estimulação da sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Modificações a um ligante de CD40 nativo, por exemplo, ligante de CD40 humano (CD40L; também conhecido como CD 154), incluem, mas não limitadas a, substituições, deleções, truncagens, extensões, proteínas de fusão, fragmentos, peptidomimética, e similares. Em algumas modalidades da invenção, um ensaio para avaliar a atividade biológica de um anticorpo anti-CD40 antagonista inclui o uso de CD40L solúvel, por exemplo, CD40L humano recombinante solúvel (Aléxis Corporation, Bingham, Nottinghamshire, UK) para estimular a sinalização de CD40 em células que expressam CD40.

Por "sinalização de CD40 mediada por CD40L" diz-se de qualquer atividade biológica que resulte em interação do receptor de superfície celular CD40 com um ligante de CD40. Exemplos de sinalização de CD40 são sinais que levam à proliferação e sobrevivência de células expressando CD40, e estimulação de um ou mais caminhos de sinalização de CD40 em células expressando CD40. Um "caminho de sinalização" ou "caminho de transdução de sinal" de CD40 pretende significar que pelo menos uma reação biomecânica ou um grupo de reações biomecânicas que resultam da interação do receptor CD40 com um ligante de CD40, por exemplo, CD40L, e que gera um sinal que, quando transmitido através de um caminho de sinal, leva à ativação de uma ou mais moléculas no sentido da corrente na cascata de sinalização.

Caminhos de transdução de sinal envolvem um número de moléculas de transdução de sinal que levam à transmissão de um sinal dos receptores CD40 de superfície celular através da membrana do plasma de uma célula e através de um ou mais em uma série de moléculas de transdução de sinal, através do citoplasma da célula e, em alguns exemplos, para dentro do núcleo da célula. Os caminhos de transdução de sinal de CD40 incluem, por exemplo, o caminho de sinalização AKT, que leva à ativação de AKT, e finalmente à ativação de NF-KB através do caminho de sinalização de NF-KB; e caminhos de sinalização de cinase de proteína ativada por mitogênio (MAPK), incluindo o caminho de sinalização de MEK/ERK e o caminho de sinalização de MEK/p38, que leva à ativação de ERK e p38, respectivamente. O equilíbrio entre ativação e bloqueio destes caminhos de sinalização favorece ou a sobrevivência da célula ou sua apoptose.

Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas estáveis da invenção compreendem anticorpo anti-CD40 antagonista que bloqueiam a sinalização de CD40 mediada por CD40L. Para uma descrição mais detalhada do papel de 5 anticorpo anti-CD40 antagonista no bloqueio de sinalização de CD40 mediada por CD40L, ver, por exemplo, os pedidos provisórios intitulados "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use", depositados em 4 de novembro de 2003, 26 de novembro de 2003 e 27 de abril de 10 2004, e Pedidos de Patente U. S. cedidos de número 60/517.337 (procuração de número PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (procuração de número PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (procuração de número PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente, e 15 Pedido de de Patente Internacional de número PCT/US2004/037152 (procuração de número PP20107.004 (035784/282916)), também intitulada "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use" depositada em 4 de novembro de 2004 e publicada como WO 2005/044854; o 20 conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Ver também o pedido provisório intitulado "Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling", depositado em 9 de dezembro de 2005, e Pedido de Patente 25 U.S. cedida de número 60/749.285 (procuração de número PP028035.0002 (035784/304312)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019414 (procuração de número PP028035.0003 (035784/311611)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 30 2006/125143; e pedido de patente provisório intitulado

"Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component," depositado em 9 de dezembro de 2005, e Patente U. S. cedida de número 60/749.336 (procuração de número PP028062.0002 (035784/304311)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019325 (procuração de número PP028062.0003 (035784/311608)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 2006/125117; o conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência em 10 sua totalidade.

As composições farmacêuticas líquidas estáveis da presente invenção compreendem anticorpos anti-CD40, particularmente anticorpos anti-CD40 antagonistas e/ou fragmentos de ligação ao antígeno destes. Os seguintes 15 termos e definições se aplicam a tais anticorpos.

"Anticorpos" e "imunoglobulinas" (Igs) são glicoproteínas possuindo as mesmas características estruturais. Os termos são utilizados como sinônimos. Em alguns exemplos, a especificidade do antígeno da 20 imunoglobulina pode ser conhecida.

O termo "anticorpo" é utilizado em seu sentido mais amplo e cobre anticorpos completamente montados, fragmentos de anticorpos que podem se ligar a抗ígenos (por exemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, anticorpos de cadeia única, diacorpos, 25 quimeras de anticorpos, anticorpos híbridos, anticorpos bispecíficos, anticorpos humanizados, e similares), e peptídeos recombinantes compreendendo os anteriores.

Os termos "anticorpo monoclonal" e "mAb" conforme aqui utilizados, referem-se a um anticorpo obtido a partir de 30 uma população substancialmente homogênea de anticorpos,

isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto pelas possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em menores quantidades.

5 "Anticorpos nativos" e "imunoglobulinas nativas" são geralmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 daltons, composta de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada por uma ligação de disulfeto covalente, enquanto o número de ligações de disulfeto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isótipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve pode também possuir pontes de disulfeto entre as cadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada possui em uma extremidade um domínio variável (V_H) seguido por vários domínios constantes. Cada cadeia leve possui um domínio variável em uma extremidade (V_L) e um domínio constante em sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve está alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve está alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácido particulares formam uma interface entre os domínios variáveis de cadeias leves e pesadas.

O termo "variável" refere-se ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente em seqüência entre os anticorpos. Regiões variáveis conferem especificidade de ligação a antígeno. Entretanto, a variabilidade não é uniformemente distribuída por todos os domínios variáveis de anticorpos. Ela está concentrada em 30 três segmentos chamados de regiões determinantes de

complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis, ambas nos domínios da cadeia leve e da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são distribuídas nas regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis de cadeias pesadas e leves nativas compreendem, cada uma, quatro regiões FR, adotando amplamente uma configuração de folha dobrada em "P", conectada por três CDRs, que formam círculos se conectando, e em alguns casos formando parte da estrutura de folha dobrada em "P". As CDRs em cada cadeia são mantidas unidas em estreita proximidade pelas regiões FR e com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do local de ligação de antígeno de anticorpos (ver, Kabat e outros, (1991) *NIH Publ. N°. 91-3242*, Vol. I, págs. 647-669). Os domínios constantes são estando envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, como ligação a receptor Fc (FcR), participação do anticorpo em toxicidade celular dependente de anticorpo, iniciação de citotoxicidade dependente de complemento, e desgranulação de mastócitos.

O termo "região hipervariável", quando aqui utilizado, refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis por ligação a antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (isto é, resíduos 23-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável de cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; Kabat e outros, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a Ed., Public Health Service, National Institute of Health,

Bethesda, MD) e/ou aqueles resíduos de um "laço hipervariável" (isto é, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2), e 91-96 (L3) no domínio variável de cadeia leve e (H1), 53-55 (H2), e 96-101 (H3) no domínio variável de cadeia pesada; 5 Clothia e Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917). Resíduos de "estrutura" ou "FR" são aqueles resíduos de domínios variáveis que não os resíduos de regiões hipervariáveis, conforme aqui avaliados.

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região de ligação a antígeno ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab, F(ab')₂ e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata e outros, (1995) *Protein Eng.* 10:1057-1062); moléculas de anticorpo de cadeia simples e anticorpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticorpos. A digestão de papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação a抗ígenos idênticos, chamados fragmentos "Fab", cada um com um local de ligação a antígeno único, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade de cristalizar prontamente. O tratamento com pepsina produz um fragmento F(ab')₂ que possui dois locais de combinação a antígeno e é ainda capaz de entrecruzamento a antígeno. 15 20 25

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um local de reconhecimento e ligação de antígeno completo. Esta região consiste de um dímero de um domínio variável de uma cadeia pesada e uma leve em associação não covalente estreita. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um local de ligação a antígeno na superfície de um dímero V_H-V_L. Coletivamente, 30

as seis CDRs conferem especificidade de ligação a antígeno ao anticorpo. Entretanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicos para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e se ligar a antígeno, embora a uma afinidade menor que todo o local de ligação.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante (C_{H1}) da cadeia pesada. Os fragmentos Fab diferem dos fragmentos Fab' pela adição de uns poucos resíduos no terminal carbóxi do domínio C_{H1} cadeia pesada incluindo uma ou mais cisteínas da região de dobradiça de anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui utilizada para Fab' onde o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes portam um grupo tiol livre. Fragmentos Fab' são produzidos reduzindo-se a ponte de disulfeto de cadeia pesada de fragmentos $F(ab')_2$. Outros acoplamentos químicos de fragmentos de anticorpos são também conhecidos.

As "cadeias leves" de anticorpos (imunoglobulinas) de qualquer espécie vertebrada pode ser atribuída a um ou dois tipos claramente distintos, chamados kappa (κ) e lâmbda (λ), baseados nas seqüências de aminoácidos de seus domínios constantes.

Dependendo da seqüência de aminoácidos do domínio constante de suas cadeias pesadas, as imunoglobulinas podem ser atribuídas a diferentes classes. Existem cinco principais classes de imunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, e vários destes podem ainda se dividir em subclasses (isótipos), por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Os domínios constantes de cadeia pesada que

correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamados alfa, delta, epsilon, gama e mu, respectivamente. As estruturas de subunidade e configurações tridimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem 5 conhecidas. Diferentes isótipos possuem funções efetoras diferentes. Por exemplo, isótipos IgG1 e IgG3 humanos possuem atividade ADCC (citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo).

A palavra "marcador" quando aqui utilizada refere-se a 10 um composto ou composição detectável que está conjugada diretamente ou indiretamente ao anticorpo de forma a gerar um anticorpo "marcado". O marcador pode ser detectável por si próprio (por exemplo, marcadores de radioisótopos ou marcadores fluorescentes) ou, no caso de um rótulo 15 enzimático, pode catalisar alteração química de um composto ou composição de substrato que seja detectável.

Uma "célula hospedeira", conforme aqui utilizado, refere-se a um microorganismo ou célula eucariótica ou linha celular em cultura como uma entidade unicelular que 20 pode ser, ou foi, utilizada como um recipiente para um vetor recombinante ou outros polinucleotídeos de transferência, e inclui a progenia da célula original que foi transfetada. É compreendido que a progenia de uma única célula pode não ser necessariamente completamente 25 idêntica em morfologia ou em complemento genômico ou de DNA total como o parente original, devido à mutação natural, acidental ou deliberada.

"Células efetoras humanas" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e executam funções efetoras. 30 Preferivelmente, as células expressam pelo menos FcγRIII e

executam função efetora de citotoxicidade mediada por célula dependente de antígeno (ADCC). Exemplos de leucócitos humanos que mediam ADCC incluem células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC), células naturalmente citotóxicas (NK), monócitos, macrófagos, eosinófilos, e neutrófilos, com PBMCs e células NK sendo preferidas. Anticorpos que possuem atividade ADCC são tipicamente do isótipo IgG1 ou IgG3. Observe que adicionalmente a isolar anticorpos IgG1 e IgG3, tais anticorpos mediando ADCC podem ser feitos através de engenharia de uma região variável de um anticorpo de não ADCC ou fragmento de região variável em uma região constante de isótipo IgG1 ou IgG3.

Os termos "receptor Fc" ou "FcR" são utilizados para descrever um receptor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de seqüência nativa. Além disso, um FcR preferido é aquele que se liga a um anticorpo IgG (um receptor gama) e inclui receptores das subclasses Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII, incluindo variantes alélicas e formas alternativamente unidas destes receptores. Receptores Fc γ RII incluem Fc γ RIIA (um "receptor de ativação") e Fc γ RIIB (um "receptor de inibição"), que possuem seqüências de aminoácidos similares que diferem principalmente em seus domínios citoplásmicos. O receptor de ativação Fc γ RIIA contém um motivo de ativação baseado em tirosina de imunoreceptor (ITAM) em seu domínio citoplásmico. O receptor de inibição Fc γ RIIB contém um motivo de inibição baseado em tirosina de imunoreceptor (ITIM) em seu domínio citoplásmico (ver Daeron, (1997) Annu. Rev. Immunol. 15:203-234). FcRs são analisados em

Ravetch e Kinet (1991) *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel e outros, (1994) *Immunomethods* 4:25-34; e de Haas e outros, (1995) *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341. Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, são abrangidos pelo termo "FcR" aqui utilizado. O termo também inclui o receptor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternos ao feto (Guyer e outros, (1976) *J. Immunol.* 117:587; e Kim e outros, (1994) *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

Existem várias maneiras de se produzir anticorpos humanos. Por exemplo, células secretoras podem ser imortalizadas por infecção com vírus Epstein-Barr (EBV). Entretanto, células infectadas com EBV são difíceis de clonar e geralmente produzem apenas rendimentos relativamente baixos de imunoglobulina (James e Bell, (1987) *J. Immunol. Methods* 100:5-40). No futuro, a imortalização de células B humanas pode, possivelmente, ser atingida introduzindo-se uma combinação definida de genes de transformação. Tal possibilidade é destacada por uma recente demonstração de que a expressão da subunidade catalítica de telomerase juntamente à oncoproteína grande SV40 e um alelo oncogênico de H-ras resultou na conversão tumorigênica de células humanas epiteliais e fibroblastos normais (Hahn e outros, (1999) *Nature* 400:464-468). Agora é possível produzir animais transgênicos (por exemplo, camundongos) que são capazes, em imunização, de produzirem um repertório de anticorpos humanos na ausência de produção de imunoglobulina endógena (Jakobovits e outros, (1993) *Nature* 362:255-258; Lonberg e Huszar, (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93; Fishwilde e outros (1996) *Nat.*

Biotechnol. 14:845-851; Mendez e outros, (1997) *Nat. Genet.* 15:146-156; Green, (1999) *J. Immunol. Methods* 231:11-23; Tomizuka e outros, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727; analisado em Little e outros, (2000) *Immunol. Today* 21:364-370). Por exemplo, foi descrito que a deleção de homozigotos do gene de região de união de cadeia pesada de anticorpo (J_H) em camundongos mutantes quiméricos e de linha germinativa resulta em completa inibição de produção de anticorpo endógeno (Jakobovits e outros, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551-2555). A transferência da série de genes de imunoglobulina de linha germinativa humana em tais camundongos mutantes de linha germinativa resulta na produção de anticorpos humanos sob ataque de antígeno (Jakobovits e outros, (1993) *Nature* 362:255-258).

Mendez e outros, (1997) (*Nature Genetics* 15:146-156) gerou uma linha de camundongos transgênicos que, quando atacados com um antígeno, geram anticorpos completamente humanos de alta afinidade. Isto foi alcançado por integração de linha germinativa de loci de cadeia pesada e cadeia leve humana de megabase em camundongos com deleção em segmento J_H endógeno conforme descrito acima. Estes camundongos (tecnologia XenoMouse® II (Abgenix; Fremont, California)) abrigam 1.020 kb de locus de cadeia pesa humana contendo aproximadamente 66 genes V_H , regiões D_H e J_H completas e três regiões constantes diferentes e também abriga 800 kb de locus κ humano contendo 32 genes V_K , segmentos J_K e genes C_K . Os anticorpos produzidos nestes camundongos lembram muito aqueles vistos em humanos em todos os aspectos, incluindo rearrumação, montagem e repertório de gene. Os anticorpos humanos são preferencialmente expressos

sobre anticorpos devido à deleção em segmento endógeno que evita a reorganização de genes no locus de rato. Estes camundongos podem ser imunizados com um antígeno de interesse particular.

5 Soros de tais animais imunizados podem ser selecionados quanto à reatividade de antícorpo contra o antígeno inicial. Linfócitos podem ser isolados de linfonodos ou células do baço e podem ainda ser selecionada quanto a células B selecionando-se células CD138 negativas e CD19 positivas. Em um aspecto, tais culturas de células B (BCCs) podem ser fundidas a células de mioma para gerar hibridomas conforme detalhado acima.

10 Em outro aspecto, tais culturas de células B podem ser selecionadas adicionalmente quanto à reatividade contra o antígeno inicial, preferivelmente. Tais seleções incluem ensaios de imunoabsorbância ligados à enzima (ELISA) com a proteína alvo/antígeno, um ensaio de competição com anticorpos conhecidos que se ligam ao antígeno de interesse e ligação *in vitro* a CHO transfetada transitoriamente ou 15 outras células que expressam o antígeno alvo.

20 Anticorpos monoclonais a CD40 são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, as seções dedicadas a antígeno de célula B em McMichael, ed. (1987; 1989) *Leukocyte Typing III and IV* (Oxford University Press, New York); Patentes U. S. de número 5.674.492; 5.874.082; 5.677.165; 6.056.959; WO 25 00/63395; Publicação Internacional de número WO 02/28905 e WO 02/28904; Gordon e outros, (1988) *J. Immunol.* 140:1425; Valle e outros (1989) *Eur. J. Immuno.* 19:1463; Clark e outros, (1986) *PNAS* 83:4494; Paulie e outros, (1989) *J. 30 Immunol.* 142:590; Gordon e outros, (1987) *Eur. J. Immuno.*

17:1535; Jabara e outros, (1990)/. *Exp. Med.* 172:1861;
Zhang e outros, (1991)/. *Immunol.* 146:1836; Gascan e
outros, (1991)/. *Immunol.* 147:8; Banchereau e outros,
(1991) *Clin. Immunol. Spectrum* 3:8; e Banchereau e outros,
5 (1991) *Science* 251:70; todos os quais estão aqui
incorporados por referência. Outros anticorpos monoclonais
anti-CD40 incluem, mas não estão limitados a, anticorpos
anti-CD40 humanizados, como SGN-40 (Tai e outros, (2004)
Cancer Res. 64:2846-52; Patente U. S. de número 6.838.261),
10 que é a forma humanizada do anticorpo anti-CD40 de ratos
SGN-14 (Francisco e outros, (2000) *Cancer Res.* 60:3225-31)
e os anticorpos agonista e antagonista divulgados no Pedido
de Patente U. S. de número 2004/0120948; aqui incorporadas
por referencia em sua totalidade.

15 De interesse particular à presente invenção são os
anticorpos anti-CD40 antagonistas ou fragmento de ligação
ao antígeno destes que servem para bloquear sinalização de
CD40 mediada por CD40L e que podem também modular ADCC,
como ocorre, por exemplo, com o anticorpo ch1212 aqui
20 descrito, abaixo.

Anticorpos anti-CD40 antagonistas para uso em
composições líquidas estáveis da invenção incluem
anticorpos monoclonais ou fragmento de ligação ao antígeno
destes que são capazes de se ligar especificamente a
25 antígeno CD40 humano expresso na superfície de uma célula
humana. Em algumas modalidades, os anticorpos anti-CD40
antagonistas nas composições farmacêuticas líquidas
estáveis exibem uma forte afinidade de ligação de sítio
único para o antígeno de superfície celular CD40. Tais
30 anticorpos monoclonais exibem uma constante de equilíbrio

de dissociação (K_D) para CD40 de pelo menos 10^{-5} M, pelo menos 3×10^{-5} M, preferivelmente pelo menos 10^{-6} M a 10^{-7} M, mais preferivelmente pelo menos 10^{-8} M a cerca de 10^{-12} M, medido utilizando-se um ensaio padrão como Biacore™. A 5 análise Biacore é conhecida na técnica e detalhes são fornecido em "BIAapplications handbook". Os métodos descritos em WO 01/27160 podem ser utilizados para modular a afinidade de ligação.

De particular interesse são os anticorpos anti-CD40 antagonistas que são livres de atividade agonista significativa conforme aqui definido acima, mas exibem atividade agonista quando ligados a antígeno CD40 em células humanas, particularmente quando ligados a antígeno CD40 em células B humanas neoplásticas. Em uma modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista está livre de atividade agonista significativa em uma resposta de célula B. Em uma outra modalidade da invenção, o anticorpo anti-CD40 antagonista está livre de atividade agonista significativa em ensaios de mais de uma resposta de célula 10 B (por exemplo, proliferação e diferenciação, ou proliferação, diferenciação e produção de anticorpo). Anticorpos anti-CD40 antagonistas adequados possuem regiões constantes humanas; preferivelmente eles também possuem regiões de estrutura totalmente ou parcialmente 15 humanizadas; e mais preferivelmente são anticorpos totalmente humanos ou fragmentos de ligação ao antígeno destes. Exemplos de tais anticorpos monoclonais são anticorpos aqui chamados de CHIR-5.9 e CHIR-12.12.

Assim, em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 20 antagonista presente nas composições farmacêuticas líquidas

estáveis da invenção é o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12. Os anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 são anticorpos monoclonais anti-CD40 completamente humanos do isótipo IgG₁ produzidos a partir de linhas celulares de hibridoma 131.2F8.5.9 (aqui chamada de linha celular 5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.2 (aqui chamada de linha celular 12.12). Estas linhas celulares foram criadas utilizando-se esplenócitos de camundongos xenotípicos imunizados contendo locus de cadeia pesada IgG₁ humana e o locus de cadeia κ humana (XenoMouse® technology; Abgenix; Fremont, California). As células do baço foram fundidas com as células do mieloma SP2/0 (Sierra Biosource). Os hibridomas resultantes foram sub-clonados diversas vezes para criar as linhas celulares monoclonais estáveis 5.9 e 12.12. Outros anticorpos da invenção podem ser preparados de forma similar utilizando-se transgênico de camundongos para loci de imunoglobulina humana ou por outros métodos conhecidos na técnica e/ou aqui descritos.

O nucleotídio e seqüências de aminoácido das regiões variáveis do anticorpo CHIR-12.12 e as seqüências de aminoácido das regiões variáveis do anticorpo CHIR-5.9 são aqui descritas. Mais particularmente, as seqüências de aminoácido para as regiões líder, variável e constante para a cadeia leve e cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 são expostas na Id. de Seq. nº 2 (seqüência completa para a cadeia leve CHIR-12.12), Id. de Seq. nº 4 (seqüência completa para a cadeia pesada para mAb CHIR-12.12), e Id. de Seq. nº 5 (seqüência completa para uma variante da cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 exposta na Id. de Seq. nº 4, onde a variante compreende uma substituição de serina

para o resíduo alanina na posição 153 da Id. de Seq. nº 4). As seqüências de nucleotídios codificando a cadeia leve e cadeia pesada para mAb CHIR-12.12 são expostas na Id. de Seq. nº 1 (seqüência de codificação para a cadeia leve para 5 mAb CHIR-12.12) e Id. de Seq. nº 3 (seqüência de codificação para a cadeia pesada para mAb CHIR-12.12). As seqüências de aminoácido para as regiões líder, variável e constante para a cadeira leve e cadeia pesada da CHIR-5.9 mAb são expostas na Id. de Seq. nº 6 (seqüência completa 10 para a cadeia leve de mAb CHIR-5.9), Id. de Seq. nº 7 (seqüência completa para a cadeia pesada de mAb CHIR-5.9) e Id. de Seq. nº 8 (seqüência completa para uma variante da cadeia pesada de mAb CHIR-5.9 exposta na Id. de Seq. nº 7, onde a variante compreende uma substituição para o resíduo 15 alanina na posição 158 da Id. de Seq. nº 7). Adicionalmente, hibridomas expressando CHIR-5.9 (anticorpos de linha de hibridoma de camundongos 131.2F8.5.9 (CMCC# 12047) e CHIR-12.12 (linha de hibridoma de camundongo 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC# 12056) foram depositados com a 20 ATCC (American Type Culture Collection; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (E.U.A.)) em 17 de setembro de 2003, com uma designação de depósito de patente de PTA-5542 e PTA-5543, respectivamente.

Adicionalmente à atividade antagonista, anticorpos 25 anti-CD40 para uso nas composições farmacêuticas líquidas estáveis da presente invenção podem possuir outro mecanismo de ação contra uma célula tumorosa. Por exemplo, anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 nativos possuem atividade ADCC. Alternativamente, as regiões variáveis dos anticorpos CHIR- 30 5.9 e CHIR-12.12 podem ser expressas em outro isótipo de

anticorpo que possua atividade ADCC. É também possível conjugar formas nativas, formas recombinantes ou fragmentos de ligação ao antígeno de CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 a uma citotoxina, um agente terapêutico ou um íon metálico 5 radioativo ou radioisótopo, conforme observado abaixo.

Os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 ligam-se a CD40 solúvel em ensaios do tipo ELISA, evitam as ligações de ligantes de CD40 a CD40 de superfície celular e deslocam o ligante de CD40 pré-ligado, conforme determinado 10 por ensaios citométricos de fluxo. Anticorpos CHIR-5.9 e CHIR-12.12 competem entre si para se ligarem a CD40 mas não com 15B8, o anticorpo monoclonal anti-CD40 descrito no Pedido de Patente Provisório U. S. de número de série 60/237.556, intitulado "Human Anti-CD40 Antibodies" 15 depositado em 2 de abril de 2000 e Pedido Internacional PCT de número PCT/US01/30857, também intitulado "Human Anti-CD40 Antibodies", depositado em 2 de outubro de 2001 (procuração de número PP16092.003), ambos os quais estão aqui incorporados em sua totalidade por referência. Quando 20 testados *in vitro* quanto a efeitos na proliferação de células B de indivíduos humanos normais, CHIR-5.9 e CHIR-12.12 atuam como antagonistas de anticorpos anti-CD40. Além disso, CHIR-5.9 e CHIR-12.12 não induzem a forte proliferação de linfócitos humanos a partir de indivíduos 25 normais. Estes anticorpos são capazes de matar células alvo expressando CD40 por citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). A afinidade de ligação de CHIR-5.9 para CD40 humano é de $1,2 \times 10^{-8}$ M e a afinidade de ligação de CHIR-12.12 é de 5×10^{-10} M, conforme determinado pelo 30 ensaio Biacore™.

Outros anticorpos anti-CD40 antagonistas que compartilham das características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-5.9 descritos acima incluem, mas não estão limitados, aos seguintes: (1) os anticorpos monoclonais produzidos pelas linhas celulares de hibridoma designadas 131.2F8.5.9 (aqui chamada de linha celular 5.9) e 153.8E2.D10.D6.12.12 (aqui chamada de linha celular 12.12), depositadas com a ATCC como Depósito de Patente número PTA-5542 e Depósito de Patente número PTA-5543, respectivamente; (2) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir de um grupo consistindo da seqüência mostrada na Id. de Seq. nº 2, a seqüência mostrada na Id. de Seq. nº 4, a seqüência mostrada na Id. de Seq. nº 5, ambas as seqüências mostradas em Id. de Seq. nº 2 e Id. de Seq. nº 4, e ambas as seqüências mostradas em Id. de Seq. nº 2 e Id. de Seq. nº 5; (3) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência mostrada em Id. de Seq. nº 6, a seqüência mostrada na Id. de Seq. nº 7, a seqüência mostrada na Id. de Seq. nº 8, ambas as seqüências mostradas na Id. de Seq. nº 6 e Id. de Seq. nº 7 e ambas as seqüências mostradas em Id. de Seq. nº 6 e Id. de Seq. nº 8; (4) um anticorpo monoclonal possuindo uma seqüência de aminoácido codificada por uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de nucleotídio selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência mostrada na Id. de Seq. nº 3 e ambas as seqüências mostradas na Id. de Seq. nº 1 e Id. de Seq. nº 3; (5) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido

pela linha celular de hibridoma 5.9 ou linha celular de hibridoma 12.12; (6) um anticorpo monoclonal que se liga a um epítopo compreendendo os resíduos 82-87 da seqüência de aminoácido mostrada na Id. de Seq. nº 10 ou Id. de Seq. nº: 5 12; (7) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação a antígeno do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou os anticorpos monoclonais anteriores nos itens precedentes (1) a (7), onde o fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao antígeno humano CD40.

10 Aqueles habilitados na técnica reconhecem que os anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno destes anticorpos descritos aqui incluem anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno que são produzidos de forma recombinante utilizando métodos bem conhecidos na técnica e 15 aqui descritos abaixo e incluem, por exemplo, anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 que foram produzidos de forma recombinante.

Anticorpos anti-CD40 antagonistas adicionais incluem os anticorpos monoclonais aqui chamados de 5D12, 3A8 e 3C6, 20 que são secretados por um hibridoma possuindo números de acesso ATCC HB 11339, HB 12024 e HB 11340, respectivamente. Ver, por exemplo, Patente U.S. de número 6.315.998, aqui incorporada por referência em sua totalidade.

25 Outros anticorpos anti-CD40 antagonistas são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, o anticorpo anti-CD40 humano produzido pelo hibridoma denominado F4-465 divulgado nos Pedidos de Patente U. S. de número 20020142358 e 20030059427; aqui incorporadas por referência 30 em sua totalidade. O F4-465 foi obtido a partir do

camundongo HAC (Kuroiwa e outros, (2000) *Nature Biotech.* 10:1086 (2000)) e consequentemente expressa a cadeia leve lâmbda humana.

Produção de Anticorpos para Composições Farmacêuticas da

5 Invenção

Os anticorpos para uso nas composições farmacêuticas da presente invenção, por exemplo, os anticorpos anti-CD40 antagonistas aqui divulgados, podem ser produzidos utilizando-se qualquer método de produção de anticorpo conhecido àqueles habilitados na técnica. Assim, soros policlonais podem ser produzidos por métodos convencionais. Em geral, uma solução contendo o antígeno de interesse, o antígeno CD40, é primeiramente usada para imunizar um animal adequado, preferivelmente um camundongo, rato, coelho ou cabra. Coelhos ou cabras são preferidos para a preparação de soros policlonais devido ao volume de soro que se pode obter, e a disponibilidade de anticorpos de anti-coelho e anti-cabra marcados.

Soros policlonais podem ser preparados em um animal transgênico, preferivelmente um camundongo portanto loci de imunoglobulina humana. Em uma modalidade preferida, células Sf9 expressando a proteína de interesse, por exemplo, CD40, são utilizadas como o imunogênio. A imunização pode ser executada misturando-se ou emulsificando-se uma solução contendo antígeno em solução salina, preferivelmente em um adjuvante como adjuvante completo de Freund, e injetando-se a mistura ou emulsão de forma parenteral (geralmente de forma subcutânea ou intramuscular). Uma dose de 500 a 200 µg/injeção é tipicamente suficiente. A imunização é geralmente acelerada de 2 a 6 semanas depois com uma ou

mais injeções da proteína em solução salina, preferivelmente utilizando-se adjuvante completo de Freund. Pode-se alternativamente gerar anticorpos por imunização *in vitro* utilizando-se métodos conhecidos na técnica o que, 5 para o propósito desta invenção, é considerado equivalente à imunização *in vivo*. Os Anti-soros policlonais são obtidos sangrando-se o animal imunizado em um recipiente de vidro ou plástico, incubando-se o sangue a 25°C por uma hora, seguido por incubação a 4°C por 2 a 18 horas. O soro é 10 recuperado por centrifugação (por exemplo, 1.000 x g por 10 minutos). Pode-se obter cerca de 20 a 50 mL por sangramento a partir de coelhos.

A produção de células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) é divulgada na Patente U. S. de número 6.004.552, aqui 15 incorporada por referência. No caso de CD40, resumidamente, seqüências codificando CD40 humano foram recombinadas em um baculovírus utilizando-se vetores de transferência. Os plasmídeos foram co-transfetados com DNA de baculovírus do tipo selvagem em células Sf9. As células Sf9 infectadas com 20 baculovírus recombinante foram identificadas e purificadas de forma clonal.

Preferivelmente, o anticorpo é monoclonal na natureza. Por "anticorpo monoclonal" diz-se que um anticorpo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de 25 anticorpos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto pelas possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em menores quantidades. O termo não está limitado em relação à espécie ou fonte do anticorpo. O termo engloba 30 imunoglobulinas completas assim como fragmentos como Fab,

F(ab')₂, Fv e outros que retém a função de ligação do anticorpo ao antígeno. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único local antigênico; por exemplo, no caso de anticorpos anti-CD40, o 5 antígeno de superfície celular de CD40. Além disso, ao contrário às preparações de anticorpo convencionais (policlonais) que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal está direcionado contra um único 10 determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por qualquer método em particular. Por exemplo, os 15 anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser produzidos pelo método hibridoma primeiramente descrito em Kohler e outros, (1975) *Nature* 256:495, ou podem ser produzidos por métodos de DNA recombinantes (ver, por exemplo, Patente U. S. de número 20 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem ser também isolados a partir de bibliotecas de anticorpos fago utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em Clarckson e outros, (1991) *Nature* 352:624-628; Marks e outros, (1991)/. *Mol. Biol.* 222:581-597; e Patente U. S. de número 25 5.514.548.

Por "epítopo", diz-se da parte de uma molécula antigênica para a qual um anticorpo é produzido e à qual o anticorpo se ligará. Epítulos podem compreender resíduos de aminoácido lineares (isto é, resíduos no epítopo são 30 dispostos seqüencialmente um após o outro de uma madeira

linear), resíduos de aminoácidos não lineares (chamados aqui de "epítopos não lineares"; estes epítopos não estão dispostos seqüencialmente), ou tanto resíduos de aminoácidos lineares e não lineares.

5 Anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando-se o método de Kohler e outros, (1975) *Nature* 256:495-496, ou uma modificação deste. Tipicamente, um camundongo é imunizado com uma solução contendo um antígeno. A imunização pode ser executada misturando-se ou
10 emulsificando-se uma solução contendo antígeno em solução salina, preferivelmente em um adjuvante como adjuvante completo de Freund, e injetando-se a mistura ou emulsão de forma parenteral. Qualquer método de imunização conhecido na técnica pode ser utilizado para se obter os anticorpos
15 monoclonais da invenção. Após a imunização do animal, o baço (e, opcionalmente, vários linfonodos grandes) é/são removido(s) e dissociado(s) em células únicas. As células do baço podem ser selecionadas aplicando-se uma suspensão a uma placa ou cavidade revestida com os抗ígenos de
20 interesse. As células B expressando imunoglobulina ligada a imunoglobulina específica para o antígeno se liga à placa e não são rinsadas. As células B resultantes, ou todas as células do baço dissociadas, são então induzidas a fundir com células de mieloma para formarem hibridomas, e são
25 postas em cultura em um meio seletivo. As células resultantes são colocadas em placas por diluição serial e são submetidas a ensaio para a produção de anticorpos que se liguem especificamente ao antígeno de interesse (e que não se liguem a抗ígenos não relacionados). Os hibridomas
30 que secretam o anticorpo (mAb) monoclonal selecionado são

então colocadas em cultura seja *in vitro* (por exemplo, em garrafas de cultura de tecido ou reatores de fibra oca), ou *in vivo* (como ascites em camundongos).

Onde os anticorpos anti-CD40 antagonistas devem ser
5 preparados utilizando-se métodos de DNA recombinante, o DNA
codificando os anticorpos monoclonais é prontamente isolado
e seqüenciado utilizando-se procedimentos convencionais
(por exemplo, utilizando-se marcadores de oligonucleotídeos
que são capazes de se ligar especificamente a genes
10 codificando as cadeias pesadas e leves de anticorpos de
ratos). As células de hibridoma aqui descritas servem como
uma fonte preferida de tal DNA. Uma vez isolado, o DNA pode
ser colocado em vetores de expressão, que são então
transfetados em células hospedeiras como células *E. Coli*,
15 células COS de macacos, células ovarianas de Hamsters
Chineses (CHO), ou células de mieloma que de outra forma
não produzam proteína imunoglobulina para obter a síntese
de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras
recombinantes. Artigos de análise sobre expressão
20 recombinante em bactérias de DNA codificando o anticorpo
incluem Skerra e outros, (1993) *Curr. Opinion in Immunol.*
5:256 e Phickthun, (1992) *Immunol. Revs.* 130:151.
Alternativamente, o anticorpo pode ser produzido em uma
linha celular como uma linha celular CHO, conforme
25 divulgado nas Patentes U. S. de número 5.545.403;
5.545.405; e 5.998.144; aqui incorporadas por referência.
De forma resumida, a linha celular é transfetada com
vetores capazes de expressar uma cadeia leve e uma cadeia
pesada, respectivamente. Ao transfetar as duas proteínas
30 em vetores separados, pode-se produzir anticorpos

quiméricos. Outra vantagem é a correta glicolização do anticorpo.

Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação ao antígeno destes, é produzido em células CHO utilizando o sistema de expressão de gene GS (Lonza Biologics, Portsmouth, New Hampshire), que usa glutamina sintetase como um marcador. Ver também, as Patentes U. S. de número 5,122,464; 5,591,639; 10 5,658,759; 5,770,359; 5,827,739; 5,879,936; 5,891,693; e 5,981,216; cujas divulgações estão aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

Adicionalmente, anticorpos para uso nas composições farmacêuticas da invenção podem ser anticorpos quiméricos que possuem as características de ligação desejadas. Assim, por exemplo, anticorpos anti-CD40 quiméricos para uso nos métodos da invenção poderiam possuir as características de ligação dos anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui descritos. Por anticorpos "quiméricos", diz-se de 20 anticorpos que são, mais preferivelmente, derivados utilizando técnicas de ácido desoxirribonucléico recombinantes e que compreendam componentes humanos (incluindo espécies "relacionadas" imunologicamente, por exemplo, chimpanzés) e não humanos. Assim, a região 25 constante do anticorpo quimérico é mais preferivelmente substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo quimérico é, mais preferivelmente, derivada de uma fonte não humana e possui a especificidade antigênica desejada 30 para o antígeno de interesse, isto é, o antígeno CD40. A

fonte não humana pode ser qualquer fonte vertebrada que possa ser utilizada para gerar anticorpos a um antígeno humano ou material compreendendo um antígeno CD40 humano. Tais fontes não humanas incluem, mas não estão limitadas a, 5 roedores (por exemplo, coelho, rato, camundongo, etc.; ver, por exemplo, Patente U. S. de número 4.816.567, aqui incorporada por referência) e primatas não humanos (por exemplo, primatas do Velho Mundo, macacos, etc.; ver, por exemplo, Patentes U. S. de número 5.750.105 e 5.756.096, 10 aqui incorporadas por referência). Conforme aqui utilizada, a frase "imunologicamente ativo", quando utilizado em referência, por exemplo, a anticorpos anti-CD40 quiméricos, significa um antícorpo quimérico que se liga a CD40 humano.

Por "humanizado", diz-se de formas de anticorpos que 15 contêm seqüência mínima derivada de seqüências de imunoglobulina não humana. Em sua maioria, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo receptor) no qual resíduos de uma região hipervariável (também conhecida como região determinante complementar ou 20 CDR) do receptor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo do doador) como camundongo, rato, coelho ou primata não humano possuindo especificidade, afinidade e capacidade desejadas. A frase "região determinante de 25 complementaridade" refere-se a seqüências de aminoácidos que, juntas, definem a afinidade e a especificidade de ligação da região Fv natural de um sítio de ligação de imunoglobulina nativo. Ver, por exemplo, Cothia e outros, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Kabat e outros, (1991) *U. 30 S. Dept. of Health and Human Services, NIH Publication N°*

91-3242). A frase "região constante" refere-se à porção da molécula de anticorpo que confere as funções efetoras. Em trabalho anterior direcionado à produção de anticorpos não imunogênicos para uso em terapia de doença humana, regiões constantes de camundongos foram substituídas por regiões constantes humanas. As regiões constantes dos anticorpos humanizados de interesse foram derivadas de imunoglobulinas humanas. Entretanto, estes anticorpos humanizados ainda extraíam uma resposta imune indesejada e potencialmente perigosa em humanos e havia uma perda de afinidade. Anticorpos humanizados, por exemplo, anticorpos anti-CD40 humanizados, para uso nas composições farmacêuticas da presente invenção possuem características de ligação similares àquelas exibidas pelo anticorpo parente de interesse, por exemplo, os anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui descritos.

A humanização pode ser essencialmente executada seguindo-se o método de Winter e colaboradores (Jones e outros, (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann e outros, (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven e outros, (1988) *Science* 239:1534-1536), substituindo-se CDRs ou seqüências de CDRs de roedores ou roedores mutantes pelas respectivas seqüências de um anticorpo humano. Ver também, as Patentes U. S. de número 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5,693,762; 5,859,205; aqui incorporadas por referência. Em alguns exemplos, resíduos nas regiões de estrutura de uma ou mais regiões variáveis da imunoglobulina humana são substituídas por resíduos não humanos correspondentes (ver, por exemplo, Patentes U. S. de número 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; e 6,180,370). Além disso, anticorpos humanizados podem

compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo receptor ou no anticorpo doador. Estas modificações são feitas para refinar adicionalmente o desempenho do anticorpo (por exemplo, para obter afinidade desejada). Em 5 geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, dos quais todas ou substancialmente todas as regiões hipervariáveis correspondem àquelas de imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas 10 as regiões de estrutura são aquelas de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para detalhes adicionais ver Jones e 15 outros, (1986) *Nature* 331:522-525; Riechmann e outros, (1988) *Nature* 332:323-329; e Presta, (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596; aqui incorporados por referência. Desta forma, tais anticorpos "humanizados" podem incluir 20 anticorpos onde substancialmente menos de um domínio variável humano intacto tenha sido substituído pela seqüência correspondente de uma espécie não humana. Na prática, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos CDR, e possivelmente alguns resíduos de estrutura, são substituídos por resíduos 25 de sítios análogos em anticorpos de roedores. Ver, por exemplo, as Patentes U. S. de número 5.225.539; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 5.859.205. Ver também Patente U. S. de número 6.180.370 e Publicação Internacional de número WO 01/27160, onde anticorpos humanizados e técnicas para 30 produção de anticorpos humanizados possuindo afinidade

melhorada para um antígeno predeterminado são divulgados.

A presente invenção pode ser também praticada utilizando-se anticorpos xenogênicos ou modificados produzidos em um hospedeiro mamífero não humano, mais particularmente um camundongo transgênico caracterizado por imunoglobulina endógena desativada. EM tais animais transgênicos, os genes endógenos competentes para a expressão de subunidades leves e pesadas de imunoglobulinas hospedeiras tornam-se não funcionais e substituídas com os loci de imunoglobulina humana análogos. Estes animais transgênicos produzem anticorpos humanos na ausência substancial de subunidades de imunoglobulinas hospedeira leve ou pesada. Ver, por exemplo, as Patentes U. S. de número 5.877.397 e 5.939.598, aqui incorporadas por referência.

Em algumas modalidades, anticorpos para CD40 completamente humanos, por exemplo, são obtidos imunizando-se os camundongos transgênicos. Tal camundongo é obtido utilizando-se tecnologia XenoMouse® (Abgenix; Fremont, California), e é divulgada nas Patentes U. S. de número 6.075.181, 6.091.001, e 6.114.598, todas as quais estão aqui incorporadas por referência. Para produzir os anticorpos aqui divulgados, camundongos transgênicos para o locus de cadeia pesada IgG₁ humano e locus de cadeia leve κ humano foram imunizados com células Sf9 expressando CD40 humano. Camundongos podem ser também transgênicos para outros isótipos. Anticorpos anti-CD40 totalmente humanos úteis nas composições farmacêuticas líquidas da presente invenção são caracterizadas pelas propriedades de ligação similares àquelas exibidas pelos anticorpos monoclonais

CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui divulgados.

Fragmentos de um anticorpo particular de interesse, por exemplo, um anticorpo anti-CD40, incluindo anticorpo anti-CD40 antagonista, são adequados para uso nas composições farmacêuticas líquidas estáveis da invenção desde que retenham a afinidade necessária do anticorpo de comprimento total. Assim, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 reterá a capacidade de se ligar ao antígeno de superfície de célula B CD40. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades similares às do anticorpo de comprimento total correspondente. Assim, por exemplo, um fragmento de um anticorpo anti-CD40 antagonista de comprimento total se ligará especificamente a um antígeno CD40 humano expresso na superfície de uma célula humana e está livre de atividade agonista significativa, mas exibe atividade antagonista quando ligado a um antígeno CD40 em uma célula humana que expressa CD40. Tais fragmentos são também chamados aqui de fragmentos de "ligação a抗igenico".

Fragmentos de ligação a antígeno adequados de um anticorpo compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a região de ligação a antígeno ou variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, mas não estão limitados a, fragmentos Fab, F(ab')₂ e Fv e moléculas de anticorpo de cadeia simples. Por "Fab" diz-se de um fragmento de ligação a antígeno monovalente de uma imunoglobulina que é composta da cadeia leve e parte da cadeia pesada. Por "F(ab')₂" diz-se de um fragmento de ligação a antígeno bivalente de uma imunoglobulina que contém ambas as cadeias leves e parte de

ambas as cadeias pesadas. Por fragmentos de anticorpo "Fv de cadeia simples" ou "sFv", diz-se de fragmentos compreendendo os domínios V_H e V_L de um anticorpo, onde estes domínios estão presentes em uma cadeia de polipeptídeo simples. Ver, por exemplo, as Patentes U. S. de número 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030, e 5.856.456, aqui incorporadas por referência. Geralmente, o polipeptídeo Fv compreende ainda um agente de ligação de polipeptídeo entre os domínios V_H e V_L que possibilitem que o sFv forme a estrutura desejada para ligação a antígeno. Para uma análise de sFv, ver see Pluckthun, (1994) em *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenburg e Moore (Springer-Verlag, New York), págs. 269-315. Fragmentos de ligação a antígeno dos anticorpos anti-CD40 antagonistas aqui divulgados podem ser também conjugados a uma citotoxina para efetuar a morte das células cancerosas alvo, conforme descrito aqui abaixo.

Anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpo utilizando as técnicas descritas, por exemplo, em McCafferty e outros, (1990) *Nature* 348:552-554, (1990) e Patente U. S. de número 5.514.548. Clarkson e outros, (1991) *Nature* 352:624-628 e Marks e outros, (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597, descrevem o isolamento de anticorpos de ratos e humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fago. Publicações subsequentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa nM) por embaralhamento de cadeia (Marks e outros, (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), assim como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia

para construção de bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse e outros, (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2265-2266). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis a técnicas de hibridoma de anticorpo monoclonal tradicionais para isolamento de anticorpos monoclonais.

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para a produção de fragmentos de anticorpos. Tradicionalmente, estes fragmentos foram derivados através de digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto e outros, (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) e Brennan e outros, (1985) *Science* 229:81). Entretanto, estes fragmentos podem ser produzidos agora diretamente células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpo discutidas acima. Alternativamente, os fragmentos Fab'-SH podem ser diretamente recuperados de *E. Coli* e quimicamente acoplados para formarem fragmentos F(ab')₂ (Carter e outros, (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente por cultura de cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão aparentes àqueles habilitados na prática.

Anticorpos anti-CD40 antagonistas para uso nas composições farmacêuticas líquidas estáveis da presente invenção incluem anticorpos monoclonais CHIR-5.9 e CHIR-12.12 aqui divulgados assim como anticorpos diferindo deste anticorpo mas retendo as CDRs; e anticorpos com um ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos, onde a

atividade antagonista é medida por inibição de proliferação e/ou diferenciação de células B. A invenção também engloba anticorpos desimunizados, particularmente anticorpos anti-CD40 antagonistas desimunizados, que podem ser produzidos conforme aqui descrito, por exemplo, nas Publicações Internacionais de número WO 98/52976 e WO 0034317; aqui incorporadas por referência. Desta forma, resíduos nos anticorpos anti-CD40 antagonistas da invenção são modificados de forma a tornarem os anticorpos não ou menos imunogênicos a humanos enquanto retêm sua atividade antagonista em relação a células expressando CD40 humano, onde tal atividade é medida por ensaios aqui observados em outro momento. Também estão incluídas no escopo da presente invenção a fusão de proteínas compreendendo um anticorpo de interesse, por exemplo, um anticorpo anti-CD40 antagonista ou um fragmento de ligação ao antígeno deste, cuja fusão de proteínas pode ser sintetizada ou expressa a partir de vetores de polinucleotídeo correspondentes, conforme é conhecido na técnica. Tais proteínas de fusão são descritas com referência à conjugação de anticorpos conforme aqui observado.

Qualquer anticorpo conhecido possuindo a especificidade de ligação de interesse pode possuir variações de seqüência produzidas utilizando-se os métodos descritos, por exemplo, nas Publicações de Patentes de número EP 0 983 303 A1, WO 00/34317, e WO 98/52976, aqui incorporadas por referência. Por exemplo, foi mostrado que seqüências na CDR podem fazer co que um anticorpo se ligue a MHC Classe II e disparem uma resposta de célula T ajudante indesejada. Uma substituição conservativa pode

permitir que o anticorpo retenha a atividade de ligação e ainda peca sua capacidade de disparar uma resposta de célula T indesejada. Quaisquer substituições conservativas ou não conservativas podem ser realizadas utilizando-se 5 métodos reconhecidos na técnica, como aqueles aqui observados e os anticorpos resultantes podem ser também utilizados nas composições farmacêuticas líquidas estáveis da presente invenção. Os anticorpos variantes podem ser testados de forma rotineira quanto a atividade particular, 10 por exemplo, atividade antagonista, afinidade e especificidade utilizando métodos aqui descritos.

O anticorpo anti-CD40 antagonista produzido por qualquer dos métodos descritos acima, ou qualquer outro método não divulgado aqui, pode ser utilizado de uma 15 maneira similar ao anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 onde possuem pelo menos uma das seguintes atividades biológicas: inibição de secreção de imunoglobulina por células B periféricas humanas normais estimuladas pro células T; inibição da sobrevivência e/ou proliferação de células B 20 periféricas humanas normais estimuladas por células T de Jurkat; inibição de sobrevivência e/ou proliferação de células B periféricas humanas normais estimuladas por células expressando CD40L ou ligante CD40 solúvel (sCD40L); inibição de "sobrevivência" de sinais intracelulares anti- 25 apoptóticos em qualquer célula estimulada por sCD40L ou CD40L de fase sólida; inibição de transdução de sinal de CD40 em qualquer célula quando da ligação a sCD40L ou CD40L de fase sólida; inibição de proliferação de células B malignas; indução de deleção, anergia e/ou tolerância de 30 células alvo portando CD40 ou células portanto ligantes

cognatos a CD40 incluindo, mas não limitados a, células T e células B; indução de expansão ou ativação de células T reguladoras de CD4⁺CD25⁺ (ver, por exemplo, rejeição de tecido específica de aloantígeno de doador via interferência de CD40-CD40L, van Maurik e outros, (2002) *J. Immunol.* 169:5401-5404); citotoxicidade através de qualquer mecanismo (incluindo, mas não limitado a, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC), citotoxicidade dependente de complemento (CDC), regulação para baixo de proliferação e/ou apoptose em células alvo); modulação de secreção de citosina de célula alvo e/ou expressão de molécula de superfície; e combinações destes. Ensaios para medir a atividade biológica desejada do anticorpo de anti-CD40 antagonista aqui divulgado e fragmentos de ligação ao antígeno deste podem ser executados conforme descrito nos pedidos provisórios intitulados "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*", depositados em 4 de novembro de 2003, 26 de novembro de 2003 e 27 de abril de 2004, e Patentes U. S. designadas de número 60/517.337 (procuração de número PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (procuração de número PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (procuração de número PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente; e Pedido de de Patente Internacional de número PCT/US2004/037152 (procuração de número PP20107.004 (035784/282916)), também intitulada "*Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use*" depositada em 4 de novembro de 2004 e publicada como WO 2005/044854; o conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Ver

também os ensaios descritos no pedido de patente provisório intitulado "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*", depositado em 9 de dezembro de 2005, e Pedido de Patente 5 U.S. cedida de número 60/749.285 (procuração de número PP028035.0002 (035784/304312)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019414 (procuração de número PP028035.0003 (035784/311611)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 10 2006/125143; e pedido de patente provisório intitulado "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*," depositado em 9 de dezembro de 2005, e Patente U. S. cedida de número 60/749.336 (procuração de número PP028062.0002 15 (035784/304311)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019325 (procuração de número PP028062.0003 (035784/311608)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 2006/125117; o conteúdo de cada uma das quais está aqui incorporado por referência em 20 sua totalidade. Ver também os ensaios descritos em Schultze e outros, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8200-8204; Denton e outros (1998) *Pediatr. Transplant.* 2:6-15; Evans e outros, (2000) *J. Immunol.* 164:688-697; Noelle, (1998) *Agents Actions Suppl.* 49:17-22; Lederman e outros, (1996) 25 *Curr. Opin. Hematol.* 3:77-86; Coligan e outros (1991) *Current Protocols in Immunology* 13:12; Kwekkeboom e outros, (1993) *Immunology* 79:439-444; e Patentes U. S. de número 5.674.492 e 5.847.082, aqui incorporadas por referência.

Um ensaio representativo para detectar os anticorpos 30 anti-CD40 antagonista específico aos epitopos do antígeno

de CD40 identificados aqui como um "ensaio de ligação competitivo". Os ensaios de ligação competitivos são ensaios sorológicos em que desconhecidos não detectados e quantificados por sua capacidade de inibir a ligação de um 5 ligante conhecido marcado ao seu anticorpo específico. Isto é também referido como um ensaio de inibição competitivo. Em um ensaio de ligação competitivo representativo, o polipeptídeo CD40 marcado é precipitado por anticorpo candidatos em uma amostra, por exemplo, em combinação com 10 anticorpos monoclonais provocados contra um ou mais epitopos dos anticorpos monoclonais da invenção. Anticorpos anti-CD40 que reagem especificamente com um epitopo de interesse podem ser identificados selecionando-se uma série de anticorpos preparada contra uma proteína CD40 ou 15 fragmento da proteína compreendendo o epitopo particular da proteína CD40 de interesse. Por exemplo, para CD40 humano, epitopos de interesse incluem epitopos compreendendo resíduos de aminoácido não lineares ou lineares da isoforma curta de CD40 humano (veja, Acesso de GenBank No. 20 NP_690593) exposto em Id. de Seq. nº:10, codificado pela seqüência exposta em Id. de Seq. nº:9, veja também o acesso de GenBank No. NM_152854), ou da isoforma longa de CD40 humano (veja os acessos de GenBank Nos. CAA43045 e NP_001241, expostos em Id. de Seq. nº:12 codificado pela 25 seqüência exposta em Id. de Seq. nº: 11; ver Acesso de GenBank número X60592 e NM_001250). Alternativamente, ensaios de ligação competitivos com anticorpos anti-CD40 antagonista adequado identificados previamente poderão ser usados para selecionar os anticorpos monoclonais 30 comparáveis aos anticorpos identificados previamente.

Os anticorpos empregados em tais imunoensaios podem ser marcados ou não marcados. Anticorpos não marcados podem ser empregados na aglutinação, anticorpos marcados podem ser empregados em uma ampla variedade de ensaios, empregando-se uma ampla variedade de marcadores. A detecção da formação de um complexo antícorpo-antígeno entre um anticorpo anti-CD40 e um epitopo de interesse pode ser facilitada fixando-se uma substância detectável ao anticorpo. Meios de detecção adequados incluem o uso de marcadores tais como radionuclídeos, enzimas, coenzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes, cromogenes, substratos de enzima ou co-fatores, inibidores de enzima, complexos de grupo prostético, radicais livres, partículas, corantes e etc. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina, β -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de grupo prostético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbelifera, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente é luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina, e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ou ^3H . Tais reagentes marcador podem ser usados em uma variedade de ensaios bem conhecidos, tais como radioimunoensaios, imunoensaios com enzima, por exemplo, ELISA, imunoensaios fluorescentes e etc. Veja, por exemplo, as Patentes U. S. de números 3.766.162; 3.791.932; 3.817.837; e 4.233.402.

Quaisquer anticorpos anti-CD40 antagonista descrito ou fragmentos de ligação de antígeno destes, podem ser conjugados antes do uso nas composições farmacêuticas da presente invenção. Métodos para produzir anticorpos conjugados são conhecidos na técnica. Assim, o anticorpo pode ser marcado usando-se marcação indireta ou um método de marcação indireta. Por "marcação indireta" ou "método de marcação indireta" quer-se dizer que um agente quelante é ligado de forma covalente a um anticorpo e pelo menos um radionuclídeo é inserido no agente quelante. Veja, por exemplo, os agentes quelantes e radionuclídeos descritos em Srivagtava e Mease (1991) *Nucl. Med. Bio.* 18:589-603, aqui incorporado por referência. Marcadores adequados incluem fluoróforos, cromóforos, átomos radioativos (particularmente ^{32}P e ^{125}I), reagentes densos de elétrons, enzimas, e ligantes possuindo companheiros de ligação específicos. As enzimas são tipicamente detectadas por sua atividade. Por exemplo, a peroxidase de raiz forte é freqüentemente detectada por sua capacidade de converter a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) em um pigmento azul, quantificável com um espectrofotômetro. "Companheiro de ligação específico" refere-se a uma proteína capaz de se ligar a uma molécula de ligante com alta especificidade, como por exemplo no caso de um antígeno e um anticorpo monoclonal específico deste. Outros companheiros de ligação específicos incluem biotina e avidina ou estreptavidina, IgG e proteína A, e as numerosas duplas receptor-ligante conhecidas na técnica. Deve-se compreender que a descrição acima não pretende categorizar os vários marcadores em classes distintas, uma vez que um mesmo marcador por servir

de vários diferentes modos. Por exemplo, ^{125}I pode servir como um marcador radioativo ou como um reagente denso de elétrons. HRP pode servir como enzima ou como antígeno para mAb. Também, pode-se combinar vários marcadores para o 5 efeito desejado.

Por exemplo, mAbs e avidina também requerem marcadores na prática desta invenção: assim, pode-se marcar um mAb com biotina, e detectar sua presença com avidina marcada com ^{125}I , ou com um mAb antibiotina marcado com HRP. Outras 10 permutações e possibilidades serão facilmente aparentes àqueles habilitados na técnica, e são considerados como equivalentes dentro do escopo da presente invenção.

Alternativamente, um anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse pode ser marcador usando-se "marcação direta" 15 ou um "método de marcação direta", onde um radionuclídeo é covalentemente ligado diretamente a um anticorpo (tipicamente através de um resíduo de aminoácido). Radionuclídeos preferidos são fornecidos em Srivagtava e Mease (1991) *supra*. O método de marcação indireta é 20 particularmente preferido. Veja também, por exemplo, as Publicações Internacionais de números WO 00/52031 e WO 00/52473, onde um agente de ligação é usado para ligar um marcador radioativo aos anticorpos, e as formas marcadas dos anticorpos anti-CD40 descrita na Patente U. S. de 25 número 6.015.542; aqui incorporada por referência.

Variantes e Anticorpos

As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser formuladas usando-se variantes de um anticorpo anti-CD40 antagonista conhecido na técnica. Tais variantes 30 irão reter as propriedades de ligação desejadas do

anticorpo de origem. Assim, por exemplo, onde um anticorpo anti-CD40 antagonista a ser formulado é um variante do anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 de origem, o anticorpo variante irá reter as propriedades de ligação do anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 de origem. Métodos para fazer as variantes do anticorpo estão geralmente disponíveis na técnica.

Por exemplo, variantes de seqüência de aminoácido de um anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 aqui descrito, podem ser preparados por mutações na seqüência de DNA clonada codificando o anticorpo de interesse. Métodos para mutagênese e alterações da seqüência de nucleotídeo são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Walker e Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel e outros (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); Patente U. S. de número 4.873.192; e as referências citadas nesta; aqui incorporadas por referência. Orientação para as substituições de aminoácidos apropriadas que não afetam a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrada no modelo de Dayhoff e outros (1978) em *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado por referência. Substituições conservativas, tal como a troca de um aminoácido com um outro possuindo propriedades similares, podem ser preferíveis. Exemplos de substituições conservativas incluem, mas não estão limitadas a Gly<=>Ala,

Val<=>Ile<=>Leu, Asp<=>Glu, Lys<=>Arg, Asn<=>Gln e
Phe<=>Trp<=>Tyr.

Na construção de variantes de um polipeptídeo do anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse, por exemplo, 5 o anticorpo CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, modificações são feitas de forma que as variantes continuem a possuir a atividade desejada, isto é, afinidade de ligação similar e, no caso de anticorpos anti-CD40 antagonistas, são capazes de ligarem-se especificamente a um antígeno CD40 humano 10 expressado na superfície de uma célula humana, e estando livre de atividade agonista significante mas exibindo atividade antagonista quando ligado a um antígeno CD40 em uma célula expressando CD40 humano. Obviamente, quaisquer mutações feitas no DNA que codifica o polipeptídeo variante 15 não devem colocar a seqüência fora do quadro de leitura e preferivelmente não criarião regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA secundária. Ver, a Publicação do Pedido de Patente EP de nº 75.444.

Além disso, a região constante de um anticorpo anti- 20 CD40 antagonista pode ser mudada para alterar a função efetora de várias formas. Por exemplo, veja Patente U. S. de número 6.737.056 B1 e Publicação de Pedido de Patente U. S. de número 2004/0132101A1, que divulgam mutações em Fc que otimizam a ligação do anticorpo aos receptores Fc.

25 Preferivelmente, variantes de um anticorpo anti-CD40 antagonista de referência possuem seqüências de aminoácido que possuem pelo menos 70% ou 75% de identidade de seqüência, preferivelmente pelo menos 80% ou 85% de identidade de seqüência, mais preferivelmente pelo menos 30 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de seqüência à

seqüência de aminoácido para o anticorpo de referência, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 aqui descrito, ou a uma porção mais curta da molécula do anticorpo de referência. Mais preferivelmente, as moléculas 5 compartilham pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência. Para os propósitos da presente invenção, a identidade de seqüência percentual é determinada usando-se o algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman usando-se uma pesquisa de *gap affine* com uma penalidade de *gap* aberto de 12 e uma penalidade de extensão de *gap* de 2, matriz BLOSUM de 62. O algoritmo de pesquisa de homologia Smith-Waterman é ensinado em Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489. Uma variante pode, por exemplo, diferir do anticorpo anti-CD40 antagonista de referência 10 por alguns, de 1 a 15, resíduos de aminoácido, apenas de 1 a 15 15 resíduos de aminoácido, tal como 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2 ou mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Com relação ao alinhamento ideal de duas seqüências de aminoácido, o segmento contínuo da seqüência de aminoácido 20 variante pode ter resíduos de aminoácido adicionais ou resíduos de aminoácido deletados em relação à seqüência de aminoácido de referência. O segmento contínuo usado para comparação à seqüência de aminoácido de referência irá incluir pelo menos 20 resíduos de aminoácido contínuos e 25 pode ser de 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácido. Correções para identidade de seqüência associada com as substituições do resíduo conservativo ou *gaps* podem ser feitas (veja, o algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman).

farmacêuticas da invenção

As composições farmacêuticas da presente invenção encontram uso no tratamento de um indivíduo possuindo câncer ou condição pré-maligna que está associada com as 5 células que expressam CD40, ou para tratar uma doença antiinflamatória e/ou doença autoimune que está associada com as células que expressam CD40. "Tratamento" está aqui definido como a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo anti-CD40 10 antagonista a um indivíduo, ou a aplicação ou administração de uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo anti-CD40 antagonista a um tecido isolado ou linha de célula de um indivíduo, onde o indivíduo possui uma doença, 15 um sintoma de uma doença, ou uma pré-disposição a uma doença, onde o propósito é curar, sarar, aliviar, abrandar, alterar, remediar, melhorar, restabelecer ou afetar a doença, os sintomas da doença ou a pré-disposição à doença.

Por "indivíduo" objetiva-se qualquer animal.

Preferivelmente, o indivíduo é um mamífero, mais 20 preferivelmente, o indivíduo é um humano. Mamíferos de importância particular que não humanos incluem, mas não estão limitados a cachorros, gatos, vacas, cavalos, ovelhas e porcos.

Quando a administração é para propósito de tratamento, 25 a administração pode ser para um propósito profilático ou terapêutico. Quando fornecida de forma profilática, a composição farmacêutica é fornecida antes de qualquer sintoma. A administração profilática da composição farmacêutica serve para impedir ou atenuar qualquer sintoma 30 subseqüente. Quando fornecida terapeuticamente, a

composição farmacêutica é fornecida no começo (ou logo após) de um sintoma.

A administração terapêutica da composição farmacêutica serve para atenuar qualquer sintoma real.

5 Rotas típicas de administração incluem, mas não estão limitadas à administração oral e parenteral, incluindo intravenosa, intramuscular, intratecal, intranasal, sublingual, intra-arterial e injeção ou infusão intraperitoneal, e injeção subcutânea. Métodos para 10 executar esta administração são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica.

Nas modalidades preferidas, as composições farmacêuticas da invenção são administradas de forma intravenosa. A administração intravenosa ocorre 15 preferivelmente por infusão durante um período de cerca de 1 a cerca de 10 horas, mais preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 8 horas, ainda mais preferivelmente de cerca de 2 a cerca de 7 horas, ainda mais preferivelmente de cerca de 4 a cerca de 7 horas, dependendo do anticorpo anti-CD40 20 antagonista sendo administrado. A infusão inicial com a composição farmacêutica pode ser dada por um período de cerca de 4 a cerca de 6 horas com infusões subseqüentes sendo entregues mais rapidamente. As infusões subseqüentes 25 podem ser administradas por um período de cerca de 1 a cerca de 6 horas, incluindo, por exemplo, cerca de 1 a cerca de 4 horas, cerca de 1 a cerca de 3 horas, ou cerca de 1 a cerca de 2 horas.

Uma quantidade farmaceuticamente efetiva de uma composição farmacêutica da invenção é administrada a um 30 indivíduo. Por "quantidade farmaceuticamente efetiva"

objetiva-se uma quantidade que é útil no tratamento de uma doença ou condição, onde o tratamento pode ser para propósito profilático ou terapêutico conforme notado aqui acima. Desta maneira, uma quantidade farmacêutica efetiva da composição irá administrar uma dose ou quantidade terapeuticamente efetiva do anticorpo anti-CD40 antagonista ao indivíduo em necessidade de tratamento. Por "dose ou quantidade terapeuticamente efetiva" ou "quantidade efetiva" é objetivado uma quantidade do anticorpo anti-CD40 antagonista que, quando administrada causa uma resposta terapêutica positiva em relação ao tratamento de um paciente com uma doença compreendendo células que expressam CD40. Em algumas modalidades da invenção, a dose efetiva terapeuticamente do anticorpo anti-CD40 antagonista, por exemplo, o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação a antígeno deste, está na faixa de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 40 mg/kg, de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 1 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, de cerca de 3 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, ou de cerca de 7 mg/kg a cerca de 12 mg/kg. É reconhecido que o método de tratamento pode compreender uma única administração de uma dose terapeuticamente efetiva ou administrações múltiplas de uma dose terapeuticamente efetiva do anticorpo anti-CD40 antagonista, ou fragmento de ligação a antígeno deste.

As composições farmacêuticas da invenção encontram uso no tratamento de qualquer indivíduo que possui câncer ou condição pré-maligna que seja responsiva ao tratamento com

um agente terapêutico de anti-CD40, mais particularmente, um anticorpo anti-CD40 antagonista. Métodos para determinada a resposta de um câncer ou condição pré-malígnas ao tratamento com um anticorpo anti-CD40 incluem ensaios de diagnóstico e prognósticos, por exemplo, os ensaios descritos no pedido de patente provisória comumente cedido e copendente intitulado "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*", depositado em 9 de dezembro de 2005, e Pedido de Patente U. S. cedido de número 60/749.285 (Procuração No. PP028035.0002 (035784/304312), e Pedido de Patente internacional correspondente de número PCT/US2006/019414 (Procuração No. PP028035.0003 (035784/311611)), depositado em 18 de maio de 2006, e publicado como WO 2006/125143; cujos conteúdos estão aqui incorporado por referência integralmente. Similarmente, a composição farmacêutica da invenção encontra uso no tratamento de qualquer indivíduo que possui uma doença inflamatória ou autoimune que seja responsiva ao tratamento com um agente terapêutico de anti-CD40, particularmente, um anticorpo anti-CD40 antagonista. Métodos para determinar a resposta de uma doença inflamatória ou autoimune ao tratamento com um anticorpo anti-CD40 incluem ensaios de diagnóstico e prognósticos, por exemplo, os ensaios descritos no pedido de patente provisória comumente cedido e co-pendente intitulado "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*", depositado em 9 de dezembro de 2005, e Pedido de Patente U. S. cedido de número 60/749.336 (Procuração No. PP028062.0002 (035784/304311)), e Pedido de Patente internacional

correspondente de número PCT/US2006/019325 (Procuração No. PP028062.0003 (035784/311608)), depositado em 18 de maio de 2006, e publicado como WO 2005/125117; cujos conteúdos estão aqui incorporado por referência integralmente.

5 "Tumor", conforme aqui usado" refere-se a todo crescimento e proliferação de células neoplásicas, se malignas ou benignas, e todas as células e tecidos pré-cancerígenos ou cancerígenos.

10 "Neoplasia", conforme aqui usado, refere-se a qualquer forma de crescimento celular desregulado ou não regulado, se maligno ou benigno, resultante de crescimento anormal de tecido. Assim "células neoplásicas" incluem células malignas e benignas possuindo crescimento celular desregulado ou não regulado.

15 Por "atividade antitumor" é objetivada uma redução na taxa de proliferação de célula expressando CD40 malignante ou acúmulo, e por conseguinte, um declínio na taxa de crescimento de um tumor existente ou em um tumor que surge durante a terapia, e/ou destruição de células neoplásicas (tumor) existentes ou de células neoplásicas recentemente formadas, e por conseguinte um decréscimo no tamanho total de um tumor durante a terapia. A terapia com as composições farmacêuticas contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção causa uma resposta fisiológica que é benéfica com 20 relação ao tratamento de cânceres e condições pré-malignas associadas com o estímulo da sinalização de CD40 em células que expressam CD40 em um humano.

Os termos "câncer" e "cancerígeno" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é 30 tipicamente caracterizada por crescimento celular não

regulado. Exemplos de câncer incluem, mas não estão limitados, a linfoma e leucemia, e tumores sólidos. Por "câncer relacionado à célula B" ou "câncer de linhagem de célula B" pretende-se dizer qualquer tipo de câncer em que o crescimento celular desregulado ou não regulado está associado com as células B.

Por "refratário" no contexto de um câncer, objetiva-se dizer que o câncer particular é resistente a, ou não responsivo à terapia com um agente terapêutico particular, por exemplo, um anticorpo anti-CD40 antagonista de interesse. Um câncer pode ser refratário à terapia com um agente terapêutico particular ou no início do tratamento com o agente terapêutico particular (isto é, não responsivo à exposição inicial ao agente terapêutico), ou como um resultado de desenvolvimento de resistência ao agente terapêutico, ou durante o curso de um primeiro período de tratamento com o agente terapêutico ou durante um período de tratamento subsequente com o agente terapêutico.

As composições farmacêuticas da presente invenção encontram uso no tratamento de um indivíduo que está em necessidade de intervenção terapêutica para um câncer ou condição pré-malígnna que é mediada pelo estímulo de sinalização de CD40 em células que expressam CD40 ou para qualquer doença inflamatória ou autoimune que seja mediada pela sinalização de CD40 em células que expressam CD40. Por "células que expressam CD40" é objetivado células normais, pré-malígnna e malignas expressando o antígeno CD40. Em algumas modalidades, a célula que expressa CD40 é uma célula B maligna. Por célula B "maligna" quer-se dizer qualquer célula B neoplásica, incluindo mas não limitada às

células B derivadas de linfomas incluindo linfomas de célula B de baixo grau, de grau intermediário e de alto grau, linfomas imunoblasticos, e linfomas que não de Hodgkin, doença de Hodgkin, linfomas induzidos por vírus 5 Epstein-Barr (EBV), e linfomas relacionados a AIDS, assim como leucemias linfooblásticas aguda de célula B, mielomas, leucemias linfocíticas crônicas e etc. Em outras modalidades, a célula que expressa CD40 é uma célula de carcinoma ou de sarcoma. Por "célula de carcinoma 10 expressando CD40" ou "célula de sarcoma expressando CD40" quer-se dizer qualquer célula de carcinoma ou sarcoma maligna (isto é, neoplásica) ou pré-maligna de um tumor sólido que expressa o antígeno de superfície de célula CD40. Para propósitos da presente invenção, células 15 cancerosas e pré-cancerosas ou pré-malignas que expressam o antígeno CD40 são referidas aqui como "células neoplásicas que expressam CD40". Métodos para detectar a expressão de CD40 nas células são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a técnicas de PCR, 20 imunohistoquímica, citometria de fluxo, mancha do Norte, ELISA e etc. Onde o tratamento com um anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação de antígeno deste é assegurados, a composição farmacêutica compreendendo o anticorpo anti-CD40 antagonista ou fragmento de ligação de 25 antígeno deste pode ser administrada por qualquer rota adequada de administração.

O indivíduo que está em necessidade de intervenção do tratamento com uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser aflijido com, ou estar em risco de 30 desenvolver ou ter recidiva com, qualquer câncer ou

condição pré-maligna que seja mediada por sinalização de CD40 nas células neoplásicas que expressam CD40. Exemplos de tais cânceres e condições pré-malignas incluem, mas não estão limitados a, quaisquer dos cânceres da linhagem de 5 célula B, malignidade hematológica de célula não B, e tumores sólidos que são bem conhecidos por serem mediados através de sinalização de CD40 em células neoplásicas que expressam CD40.

Exemplos de cânceres de linhagem de célula B que 10 compreendem células neoplásicas que expressam CD40 são leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de célula pilosa, doença de Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, 15 e os linfomas, incluindo, mas não limitados a, linfoma linfocítico pequeno difuso, folicular, DLBCL, linfoma de tecido linfóide associado com mucosa, linfoma de célula B monocitóide, linfoma esplênico, granulomatose linfomatóide, linfomatose intravascular, linfoma imunoblástico, linfoma 20 relacionado a AIDS e etc.

Assim, as composições farmacêuticas da invenção encontram uso no tratamento de indivíduos que possuem linfomas de não Hodgkin relacionado à proliferação ou acúmulo de célula B incontrolável, anormal. Para os 25 propósitos da presente invenção, tais linfomas serão referidos de acordo com o esquema de classificação *Working Formulation*, isto é, estes linfomas de célula B são categorizados como de baixo grau, grau intermediário e alto grau (veja, "The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic 30 Classification Project", *Cancer* 49(1982):2112-2135). Assim,

os linfomas de célula B de baixo grau incluem linfomas linfocítico pequeno, folicular de células pequenas clivadas e linfomas foliculares misturados de células grandes e pequenas clivadas; linfomas de grau intermediário incluem 5 linfomas folicular de célula grande, difuso de célula pequena clivada, difuso misturado de célula pequena e grande e difuso de célula grande; e linfomas de alto grau incluem linfomas imunoblásticos de célula grande, linfoblasticos e linfomas de célula pequena não clivadas do 10 tipo Burkitt e não-Burkitt.

É reconhecido que as composições farmacêuticas da invenção são úteis no tratamento terapêutico de linfomas de célula B que são classificados de acordo com o sistema Revised European and American Lymphoma Classification 15 (REAL). Tais linfomas de célula B incluem, mas não estão limitados aos linfomas classificados como neoplasmas de célula B precursores, tal como leucemia/linfoma linfoblástico B; neoplasmas de célula B periférico, incluindo leucemia linfocítica crônica de célula B/linfoma 20 linfocítico pequeno, linfoma linfoplasmacitóide/imunocitoma, linfoma de célula manto (MCL), linfoma de centro de folículo (folicular) (incluindo linfomas difusos de célula pequena, difusos misturados de célula pequena e grande, e difusos de célula grande), linfoma de célula B da zona marginal (incluindo os tipos 25 extranodal, nodal e esplênico), plasmacitoma/mieloma, linfoma difuso de célula B e célula grande subtípico primário do mediastino (tímico), linfoma de Burkitt, e linfoma de célula B de alto grau tipo Burkitt; e linfomas de célula B 30 de baixo grau ou alto grau não classificável.

As composições farmacêuticas da presente invenção podem também ser usados para tratar os indivíduos possuindo a condição pré-maligna conhecida como MGUS (gamopatia monoclonal de significância indeterminada). Aproximadamente 5 25% dos pacientes com MGUS eventualmente desenvolveram mieloma múltiplo (MM) ou uma disfunção de célula de plasma relacionada (Kyle (1993) *Mayo Clinic. Proc.* 68:26-36). A proliferação de células de plasma malignas na medula óssea, detecção de um soro ou proteína monoclonal de urina 10 (proteína M), anemia, hipercalcemias, insuficiência renal e lesões líticas de ossos são manifestações clínicas de MM, embora a MGUS seja clinicamente reconhecida como a presença de proteína M no soro ou urina sem outras características clínicas de MM (veja, por exemplo, Kyle and Lust (1989) 15 *Semin. Hematol.* 26:176-200; Greipp and Lust *Stem Cells* (1995) 13:10-21). Pacientes com MGUS são assintomáticos e possuem medições estáveis de proteína M (Kyle (1993) *Mayo Clinic. Proc.* 68:26-36). Uma vez que MGUS é identificada em 20 um indivíduo, a terapia de manutenção com uma composição farmacêutica apropriada da presente invenção, por exemplo, uma composição compreendendo um anticorpo anti-CD40 antagonista aqui divulgado, pode bloquear o desenvolvimento de mieloma múltiplo nestes indivíduos.

Particularmente, as composições farmacêuticas da 25 invenção são úteis para tratar linfomas de célula B, incluindo aqueles listados acima, que são refratários aos (isto é, resistentes aos, ou tornaram-se resistentes aos) tratamentos oncoterapêuticos de primeira linha. O termo "oncoterapêutico" pretende significar um tratamento para 30 câncer tal como quimioterapia, cirurgia, terapia com

radiação, terapia de anticorpo anticâncer único e combinações destes. Subpopulação de pacientes para quem a intervenção do tratamento com um ou mais anticorpos anti-CD40 que modula(m) a sinalização de CD40 mediada por CD40L, 5 modula(m) ADCC ou ambos é desejável.

As composições farmacêuticas da presente invenção são também úteis para tratar malignidades hematológicas relacionadas a célula não-B. Tais malignidades incluem, mas não estão limitadas a leucemias agudas; leucemias 10 mieloblásticas, leucemias mielocíticas agudas; leucemia promielócito; leucemia mielomonocítica; leucemia monocítica; eritroleucemia; leucemia granulocítica (leucemia mielocítica crônica); policitemia vera, e etc.

Os tumores sólidos que compreendem as células neoplásicas que expressam CD40, e desta forma respondem 15 beneficamente ao tratamento com as composições farmacêuticas, mas não estão limitadas a câncer de ovário, pulmão (por exemplo, câncer de pulmão de célula não pequena do carcinoma de célula escamosa, adenocarcinoma e carcinoma 20 de célula grande e câncer de pulmão de célula pequena, mama, colo, rim (incluindo, por exemplo, carcinomas de célula renal), bexiga, fígado (incluindo, por exemplo, carcinomas hepatocelulares), gástrico, cervical, próstata, nasofaringeal, de tireóide (por exemplo, carcinoma papilar 25 de tireóide), cânceres de pele tal como melanoma, e sarcoma, incluindo, por exemplo, osteossarcomas e sarcomas de Ewing.

Resultados benéficos que podem ser alcançados administrando-se uma composição farmacêutica da invenção a 30 um indivíduo com um câncer ou uma condição pré-maligna

incluem qualquer resposta terapêutica positiva com relação àquele câncer ou condição. Por "resposta terapêutica positiva" no contexto do tratamento de câncer é objetivado um melhoramento na doença em associação com a atividade antitumor do agente terapêutico anti-CD40 e/ou um melhoramento nos sintomas associados com a doença de interesse. Isto é, um efeito antiproliferativo, a prevenção de desenvolvimento de tumor adicional, uma redução no tamanho do tumor, uma redução no número de células cancerígenas, e/ou um decréscimo em um ou mais sintomas mediados pela estimulação de células que expressam CD40 pode ser observado. Assim, por exemplo, uma resposta terapêutica positiva irá referir-se a um ou mais dos seguintes melhoramentos na doença: (1) uma redução no tamanho do tumor; (2) uma redução no número de células cancerígenas (isto é, neoplásicas); (3) um aumento na morte de células neoplásicas; (4) inibição da sobrevivência de célula neoplásica; (4) inibição (isto é, retardo a algum grau, preferivelmente suspensão) de crescimento de tumor; (5) inibição (isto é, retardo a algum grau, preferivelmente suspensão) de infiltração de célula de câncer em órgãos periféricos; (6) inibição (isto é, retardo a algum grau, preferivelmente suspensão) de metástase de tumor; (7) prevenção de desenvolvimento de tumores adicionais; (8) uma taxa de sobrevivência de paciente aumentada; e (9) algum grau de melhora de um ou mais sintomas associados com o câncer. Respostas terapêuticas positivas em qualquer malignidade dada podem ser determinadas por critérios de resposta padronizados específicos àquela malignidade. A resposta tumoral pode ser avaliada por mudanças na

morfologia do tumor (isto é, carga tumoral total, tamanho do tumor e etc.) usando-se técnicas de seleção tal como escaneamento de imagem por ressonância magnética (MRI), imagem x-radiográfica, escaneamento por tomografia computadorizada (CT), imagem de escaneamento de osso, endoscopia e amostragem de biopsia de tumor incluindo aspiração de medula óssea e contagem de células tumorais na circulação. Além destas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo que está passando por terapia com composição farmacêutica contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção pode experimentar o efeito benéfico de um melhoramento nos sintomas associados com a doença. Assim, para os tumores de célula B, o indivíduo pode experimentar um decréscimo nos assim chamados sintomas B, isto é, suores noturnos, febre, perda de peso e/ou urticária. Para as condições pré-malignas, a terapia com um agente terapêutico anti-CD40 pode bloquear e/ou prolongar o tempo antes do desenvolvimento de uma condição maligna relacionada, por exemplo, desenvolvimento de mieloma múltiplo em indivíduos sofrendo de gamopatia monoclonal de significância indeterminada (MGUS).

Por "atividade antiinflamatória" é objetivada uma redução ou prevenção de inflamação. A terapia com uma composição farmacêutica contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção causa uma resposta fisiológica que é benéfica com relação ao tratamento de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória, onde a doença envolve células que expressam o antígeno CD40. É reconhecido que as composições da invenção podem ser úteis na prevenção de mudança fenotípica nas células tal como proliferação,

ativação e etc.

O indivíduo que está experimentando intervenção de tratamento com uma composição farmacêutica líquida contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção pode ser 5 aflagido com, ou estar em risco de desenvolver ou ter recidiva com qualquer doença inflamatória ou autoimune que seja mediada por sinalização de CD40 nas células que expressam CD40. Doenças inflamatórias são caracterizadas por inflamação e destruição do tecido, ou uma combinação 10 destes. "Doença inflamatória" inclui qualquer processo inflamatório imune-mediado onde o evento de iniciação ou alvo da resposta imune envolve não-autoantígeno(s), incluindo, por exemplo, aloantígenos, xenoantígenos, antígenos virais, antígenos bacterianos, antígenos 15 desconhecidos ou alérgenos.

Também, para os propósitos da presente invenção, o termo "doença(s) inflamatória(s)" inclui "doença(s) autoimune(s)". Conforme aqui usado, o termo "autoimunidade" é geralmente compreendido como abrangendo processos 20 inflamatórios imune-mediados envolvendo "autoantígenos". Em doenças autoimunes, o(s) autoantígeno(s) despertam as respostas imunes do hospedeiro.

Também, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser usadas para o tratamento de inflamação 25 associada com rejeição a transplante de tecido. "Rejeição a transplante" ou "rejeição a enxerto" refere-se a qualquer resposta imune montada em hospedeiro contra um enxerto incluindo mas não limitada a antígenos HLA, antígenos do grupo sanguíneo e etc.

30 As composições farmacêuticas da invenção podem também

ser usadas para o tratamento de enxerto *versus* doença hospedeira, tal como aquela associada com transplante de medula óssea, por exemplo. Em tal doença hospedeira *versus* enxerto, a medula óssea do doador inclui linfócitos e células que amadurecem como linfócitos. Os linfócitos do doador reconhecem os抗ígenos do receptor como não-próprios e despertam uma resposta inflamatória imune. Por conseguinte, conforme aqui usado, "doença hospedeira *versus* enxerto" ou "reação hospedeira *versus* enxerto" refere-se a qualquer resposta imune mediada por célula T em que os linfócitos do doador reagem aos抗ígenos do hospedeiro.

Exemplos de disfunções autoimunes e/ou inflamatórias incluem, mas não estão limitadas a lúpus sistêmico eritematoso (SLE), lúpus discóide, nefrite por lúpus, sarcoidose, artrite inflamatória, incluindo artrite juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome de Reiter, espondilite anquilosante, gota artrite, rejeição de transplante de órgão ou tecido, rejeição hiperaguda, aguda ou crônica e/ou doença hospedeira *versus* enxerto, esclerose múltipla, síndrome hiper IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, doença celíaca (enteropatia sensível a glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoriase, escleroderma, miastenia grave, púrpura trombocitopênica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença do complexo imune, síndrome de disfunção imune de fadiga crônica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinemia, trombólise, cardiomiopatia, pênfigo vulgar, fibrose intersticial

pulmonar, diabetes melitus Tipo I e Tipo II, hipersensibilidade do tipo retardado tipos 1, 2, 3 e 4, alergia ou doenças alérgicas, respostas imunes indesejadas /não objetivadas a proteínas terapêuticas (veja, por 5 exemplo, Pedido de Patente U. S. de número US 2002/0119151 e Koren e outros, (2002) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3:349-60), asma, síndrome de Churg-Strausswsqsq (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite de contato alérgica e irritante, urticária, alergia mediada por IgE, aterosclerose, 10 vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica e etc. Em algumas outras modalidades, as composições farmacêuticas da presente invenção são usadas para tratar inflamação pulmonar em indivíduos, incluindo 15 mas não limitado a rejeição de enxerto de pulmão, asma, sarcoidose, enfisema, fibrose cística, fibrose pulmonar idiopática, bronquite crônica, rinite alérgica e doenças alérgicas do pulmão tal como pneumonite hipersensibilidade, pneumonia eosinofílica, bronquiolite obliterante devido a 20 transplante de medula óssea e/ou pulmão ou outras causas, aterosclerose de enxerto/flebosclerose de enxerto, assim como fibrose pulmonar resultando de doenças do colágeno, vascular e autoimune tal como artrite reumatóide e lúpus eritematoso.

25 Em outras modalidades, as composições farmacêuticas da presente invenção são úteis para tratar doenças autoimunes e doenças inflamatórias que são inicialmente resistentes a, ou que desenvolvem resistência a outros tratamentos terapêuticos conhecidos cujo modo de ação é outro que 30 através da modulação de sinalização de CD40 mediada por

CD40L, modulação de ADCC ou ambos. As composições farmacêuticas da invenção podem ser usadas para tratar a subpopulação de pacientes para quem a intervenção do tratamento com um ou mais anticorpos anti-CD40 antagonistas 5 que modula(m) a sinalização de CD40 mediada por CD40L, modula(m) ADCC ou ambos é desejável.

Resultados benéficos que podem ser alcançados administrando-se as composições farmacêuticas da invenção a um indivíduo com uma doença inflamatória ou doença 10 autoimune incluem qualquer resposta terapêutica positiva com relação àquela doença. Por "resposta terapêutica positiva" no contexto de uma doença autoimune e/ou doença inflamatória é objetivado um melhoramento na doença em associação com a atividade antiinflamatória destes 15 anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno destes, e/ou um melhoramento nos sintomas associados com a doença. Isto é, um efeito antiproliferativo, a prevenção de proliferação adicional da célula que expressa CD40, uma redução na resposta inflamatória incluindo mas não limitado 20 à secreção reduzida de citoquinas inflamatórias, moléculas de adesão, proteases, imunoglobulinas (em exemplos onde a célula que porta CD40 é uma célula B), combinações destes, e etc., produção aumentada de proteínas antiinflamatórias, uma redução no número de células autorreativas, um aumento 25 na tolerância imune, inibição de sobrevivência de célula autorreativa, e/ou um decréscimo em um ou mais sintomas mediados pelo estímulo de células que expressam CD40 podem ser observados. Tais respostas terapêuticas positivas não estão limitadas à rota de administração e podem compreender 30 administração ao doador, o tecido do doador (tal como, por

exemplo, perfusão de órgão), o hospedeiro, qualquer combinação destes, e etc.

A resposta clínica pode ser avaliada usando-se técnicas de seleção tal como escaneamento de imagem por ressonância magnética (MRI), imagem x-radiográfica, escaneamento por tomografia computadorizada (CT), citometria de fluxo ou análise por separação celular ativada por fluorescência (FACS), histologia, patologia total e química do sangue, incluindo mas não limitado a mudanças detectáveis por ELISA, RIA, cromatografia e etc.

Além destas respostas terapêuticas positivas, o indivíduo que está passando por terapia com uma composição farmacêutica líquida contendo anticorpo anti-CD40 antagonista da invenção pode experimentar o efeito benéfico de um melhoramento nos sintomas associados com a doença.

Os seguintes exemplos são oferecidos por meio de ilustração e não por meio de limitação.

EXPERIMENTAL

CHIR-12.12 é um anticorpo monoclonal IgG₁ anti-CD40 humanizado completamente produzido por um processo de cultura de célula CHO. A molécula possui um peso molecular de 150 kDa, e a estrutura molecular consiste de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas juntas por ligações de dissulfeto. CHIR-12.12 tem como alvo a proteína receptora de superfície de célula CD40 humana. Ela é um antagonista forte e inibe a proliferação mediada pelo ligante de CD40 de células B normais, assim como inibe a proliferação mediada pelo ligante de CD40 *in vitro* de célula cancerígenas de pacientes com NHL e CLL. Linha de hibridoma 153.8E2.D10.D6.12.12 (CMCC# 12056) expressando o

anticorpo CHIR-12.12 foi depositada com a American Type Culture Collection [ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, Virginia 20110-2209 (USA)] em 17 de setembro de 2003 sob o Depósito de Patente de número PTA-5543.

5 Sem estar preso pela teoria, o anticorpo CHIR-12.12 é um anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista de ação dupla possuindo uma combinação única de atributos. Este anticorpo monoclonal completamente humano bloqueia as rotas de sinalização de CD40 mediada por CD40L para sobrevivência e
10 proliferação de células B; este antagonismo leva à morte célula final. CHIR-12.12 também media o reconhecimento e ligação por células efetoras, iniciando a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Uma vez que CHIR-12.12 está ligado às células efetoras, enzimas citolíticas
15 são liberadas, levando à apoptose e lise da célula B.

Para uma descrição mais detalhada das atividades biológicas de CHIR-12.12, e os ensaios usados para medi-las, veja os pedidos intitulados "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use" depositado
20 em 4 de novembro de 2003, 26 de novembro de 2003 e 27 de abril de 2004 e Pedido de Patente U. S. cedidos de números 60/517.337 (procuração de número PP20107.001 (035784/258442)), 60/525.579 (procuração de número PP20107.002 (035784/271525)), e 60/565.710 (procuração de
25 número PP20107.003 (035784/277214)), respectivamente; e Pedido de Patente Internacional de número PCT/US2004/037152 (procuração de número PP20107.004 (035784/282916)), também intitulada "Antagonist Anti-CD40 Monoclonal Antibodies and Methods for Their Use" depositada em 4 de novembro de 2004
30 e publicada como WO 2005/044854; o conteúdo de cada uma das

quais está aqui incorporado por referência em sua totalidade. Veja também, as Publicações Internacionais de números WO 2005/044304, WO 2005/044305, WO 2005/044306, WO 2005/044855, WO 2005/044307 e WO 2005/044294; cujos 5 conteúdos de cada uma estão aqui incorporados por referência integralmente. Ver também os ensaios descritos no pedido de patente provisório intitulado "*Methods for Diagnosis and Treatment of Proliferative Disorders Mediated by CD40 Signaling*", depositado em 9 de dezembro de 2005, e 10 Pedido de Patente U. S. cedida de número 60/749.285 (procuração de número PP028035.0002 (035784/304312)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019414 (procuração de número PP028035.0003 15 (035784/311611)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 2006/125143; e pedido de patente provisório intitulado "*Methods for Diagnosis and Treatment of Diseases Having an Autoimmune and/or Inflammatory Component*", depositado em 9 de dezembro de 2005, e Patente U. S. cedida de número 60/749.336 (procuração de número 20 PP028062.0002 (035784/304311)), e Pedido de Patente Internacional correspondente de número PCT/US2006/019325 (procuração de número PP028062.0003 (035784/311608)), depositado em 18 de maio de 2006 e publicado como WO 2006/125117; o conteúdo de cada uma das quais está aqui 25 incorporado por referência em sua totalidade.

As aplicações clínicas primárias de CHIR-12.12 são o tratamento de malignidades relacionadas à célula B, incluindo leucemia linfocítica crônica (CLL), mieloma múltiplo (MM) e linfoma de não-Hodgkin (NHL), e doenças 30 autoimunes e/ou inflamatórias associadas com células que

expressam CD40. O produto da droga de CHIR-12.12 para estudos clínicos é formulado a 20 mg/mL de anticorpo CHIR-12.12 em uma formulação líquida. Os estudos a seguir foram experimentados para determinar o tampão ideal, agente 5 isotonizante e vários excipientes para estabilizar o anticorpo na formulação líquida.

Exemplo 1: Efeitos de várias espécies de tampão e metionina na estabilização de CHIR-12.12

As condições da solução (por exemplo, pH, espécie de 10 tampão e força iônica) e excipientes (por exemplo, tensoativos e estabilizantes) são fatores importantes para estabilidade de uma proteína em formulação líquida. A estabilidade fisicoquímica de CHIR-12.12 é ideal a um pH de 5,5.

Entretanto, a proteína de CHIR-12.12 pode degradar-se 15 através da agregação e fragmentação sob condições de solução desfavoráveis; ela pode também oxidar, especialmente na presença de impurezas de peróxido e/ou quantidades de traços de metais introduzidas com as 20 matérias primas do excipiente tal como Tween. Os seguintes experimentos foram conduzidos para identificar a melhor espécie de tampão e excipientes apropriados para estabilizar o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 contra agregação, fragmentação e oxidação quando formulado no pH 25 máximo de 5,5.

Materiais

Os lotes da substância da droga (DS) de CHIR-12.12 para o estudo onde o lote de volume # CD021105A purificado derivado de CHO e lote # PD010705A. Os lotes de DS oram 30 produzidos em Xoma, Ltd (Berkeley, CA). As amostras da

formulação para este estudo foram preparadas por diálise da DS contra as respectivas soluções tampão seguida por reforço com a quantidade desejada de Tween. A concentração da proteína de CHIR-12.12 em todas as amostras era de 5 aproximadamente 20 mg/mL.

Métodos Analíticos

Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC)

SEC-HPLC separa as moléculas a fim de diminuir o peso molecular. Conseqüentemente, os agregados de CHIR-12.12 são 10 os primeiros a eluir da coluna de HPLC, seguido pelo monômero, com os fragmentos eluindo por último. Pureza, agregação e fragmentação de CHIR-12.12 foram analisados por um HPLC Waters Alliance usando-se a coluna Tosohas TSK-GEL 3000SW_{xi}, fosfato de sódio 50 mM, NaCl 200 mM, pH = 7,0 15 como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,7 mL/min.

Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC)

A oxidação de CHIR-12.12 foi medida usando-se um sistema de HPLC Waters Alliance com uma coluna Tosoh TSK gel butil-NPR, sulfato de amônio 2M/Tris 20 mM, pH = 7,0 20 como a fase móvel A e Tris 20 mM, pH = 7,0 como a fase móvel B a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O anticorpo CHIR-12.12 é digerido com papaína para produzir os 25 fragmentos Fab e Fc. Os produtos da oxidação de CHIR-12.12 são fragmentos Fc oxidados (metSO), que são espécies pré-Fc eluindo entre as espécies Fab principal e as espécies Fc principal a partir da coluna de HPLC.

EXPERIMENTOS E RESULTADOS

Efeito da estabilização de tampão de citrato na agregação e fragmentação

30 CHIR-12.12 do lote de DS #PD010705A foi formulado a 20

mg/mL de solução tampão de citrato, acetato, succinato ou fosfato 10 mM com NaCl 150 mM, 0,1% (p/v) de Tween 80 e pH = 5,5. As amostras da formulação foram cheias como soluções de 1,2 mL em frascos de vidro de 3 cm³ e armazenadas a 5°C, 5 25°C e 40°C. A estabilidade das amostras de CHIR-12.12 foi analisada em momentos determinados pelo ensaio por SEC.

As Figuras 1-3 mostram a análise por SEC para pureza, agregados e fragmentos, respectivamente, nas amostras armazenadas a 25°C. As Figuras 4-6 resumem a análise por 10 SEC para pureza, agregados e fragmentos, respectivamente, nas amostras armazenadas a 40°C. Todos os resultados mostram que as amostras da formulação baseada em citrato permaneceram no mais alto nível de pureza e mais baixos níveis de agregação e fragmentação entre as quatro 15 formulações testadas. Embora tenha havido pouca mudança detectada para as amostras armazenadas a 5°C por 5 meses (dados não mostrados), os dados de SEC acelerados prevê que o tampão citrato será provavelmente superior às outras três espécies de tampão usadas no melhoramento da estabilidade 20 em tempo real de longa duração do CHIR-12.12 contra agregação e fragmentação.

Efeito de Inibição de Oxidação de Tampão de Citrato em CHIR-12.12.

As amostras de estabilidade de CHIR-12.12 foram 25 preparadas em tampões de citrato, acetato e succinato com 0,1% e 0,2% (p/v) de Tween 80. As amostras foram armazenadas a 5°C, 25°C e 40°C e analisadas por Cromatografia de Interação Hidrofóbica (HIC) quanto a oxidação nos pontos de tempo predeterminados. Os produtos 30 de oxidação de CHIR-12.12 foram medidos como um percentual

de somas das espécies de pico Pré-Fc, isto é, % Pré-Fc. Os resultados na Tabela 1 mostram que a formulação baseada em citrato geraram menos produtos de oxidação que as formulações tamponadas com succinato e acetato, indicando que o tampão de citrato minimizou a oxidação de CHIR-12.12. Estes resultados sugerem que o ácido cítrico provavelmente serviu como um agente quelante para inibir a oxidação induzida por metal de traço.

A análises SEC e HIC indicaram que o tampão de citrato é superior às espécies de tampão de succinato, acetato e fosfato na proteção de CHIR-12.12 da agregação e fragmentação. O tampão de citrato é também superior aos tampões de succinato e acetato uma vez que minimiza a oxidação da proteína CHIR-12.12.

Tabela 1. Efeito de espécies de tampão na oxidação de CHIR-12.12 (20 mg/mL) conforme medido por ensaio de HIC.

Tampão de Formulação com Tween 80		Citrato 10 mM NaCl 150 mM PH 5,5	Acetato 10 mM NaCl 150 mM PH 5,5	Succinato 10 mM NaCl 150 mM PH 5,5
Concentra ção de Tween 80	Armazenamen to	% Pré-Fc	% Pré-Fc	% Pré-Fc
0,1% (p/v)	5°C, 5 meses	0,0	0,0	0,0
	25°C, 5 meses	2,6	7,1	9,4
	40°C, 3 meses	5,6	N/D*	13,5
0,2% (p/v)	5°C, 5 meses	0,0	0,0	N/D
	5°C, 8 meses	2,0	2,0	2,2

25°C, 5 meses	3,0	10,7	11,5
25°C, 8 meses	4,8	18,1	19,4
40°C, 3 meses	7,7	N/D	16,0

*N/D, não determinado.

Efeito de Inibição de Oxidação de L-Metionina em CHIR-12.12.

DS lote #CD021105A foi formulado a 20 mg/mL em citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 80 ou Tween 20 a 0,1%, assim como várias quantidades (0 a 5 mM) de L-metionina. As amostras de formulação foram preenchidas a 2m5 mL em frascos de 3 cm³ e armazenadas a 40°C. A Tabela 2 mostra os resultados de HIC para as amostras no momento inicial e a 40°C por 3 meses. No momento inicial, a oxidação de CHIR-12.12 em todas as formulações foi comparável à da substância de droga original (DS) de lote #CD 021105 A. Os níveis de oxidação na formulação sem a L-metionina foram mais que dobrados sob armazenamento a 40°C por 3 meses. Entretanto, o nível de oxidação nas formulações contendo L-metionina teve pouca alteração ao longo dos 3 meses de armazenagem a 40°C.

Os resultados indicam que L-metionina a 5 mM foi efetiva e suficiente na prevenção da oxidação de CHIR-12.12 sob as condições de armazenamento de alto stress. O efeito de inibição de oxidação de L-metionina em CHIR-12.12 foi confirmado por mapa de peptídeo licina.

Tabela 2. Efeito de Inibição de L-Metionina em oxidação de CHIR-12.12.

Formulações com 20 mg/mL de CHIR-12.12	Pré-Fc%	
	Tempo: 0	3 meses a 40°C
CHIR-12.12 DS de volume lote #CD 021105A	1,7	N/D*
citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-80 a 0,1%, pH 5,5	1,6	4,2
citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-80 a 0,1%, L- metionina 2 mM, pH 5,5	1,6	1,6
citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0.1%, pH 5,5	1,7	3,9
citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0.1%, L- metionina 2 mM, pH 5,5	1,5	1,1
citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0.1%, L- metionina 5 mM, pH 5,5	1,5	1,2

*N/D, não determinado.

EM resumo, o tampão de citrato minimiza a agregação, fragmentação e oxidação de CHIR-12.12 e, desta forma, representa um tampão ideal para a formulação líquida de CHIR-12.12. A L-metionina efetivamente inibe a oxidação de CHIR-12.12 com L-metionina 5 mM sendo preferida.

Exemplo 2: Efeitos Estabilizante de Arginina-HCl em CHIR-12.12.

O seguinte estudo foi direcionado a selecionar um agente tonificante e estabilizante para estabilidade de armazenamento de longo prazo de CHIR-12.12 formulado como uma composição farmacêutica líquida pretendida para

administração através de infusão intravenosa. Embora NaCl seja o agente isotonificante mais comumente utilizado para produtos parenterais de proteína, o mesmo pode não possuir efeitos de estabilização ideais na terapêutica com 5 anticorpo. Este estudo relata os efeitos estabilizantes comparativos de cloreto de sódio e da forma ácida de arginina (arginina-HCl) em CHIR-12.12 em uma formulação aquosa.

A substância de droga de anticorpo em volume de CHIR-10 12.12 foi formulada com um tampão de citrato a pH 5,5, empregando ou NaCl 150 mM ou L-arginina-HCl 150 mM para atingir a osmolalidade alvo de 295 mOsm/kg para a formulação líquida de CHIR-12.12 e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), cromatografia de exclusão por tamanho 15 (SEC-HPLC), SDS-PAGE, e HPLC de Troca Catiônica (CIEX-HPLC) foram utilizados para avaliar a estabilidade biofísica e/ou bioquímica do anticorpo CHIR-12.12. O estudo demonstra que L-arginina-HCl 150 mM não apenas fornece isotonicidade a uma formulação aquosa de CHIR-12.12, como também aumenta a 20 estabilidade de conformação de CHIR-12.12 contra agregação, fragmentação e desaminação. L-arginina-HCl provou ser superior a NaCl sob condições de estabilidade acelerada. Além disso, os dados de estabilidade acelerada previram uma 25 vida de armazenagem maior para a formulação de CHIR-12.12 com L-arginina-HCl.

Materiais:

A substância de droga (DS) CHIR-12.12 utilizada para este estudo foi um lote de volume purificado derivado de CHO #CD021105A. O lote de DS foi produzido por Xoma Ltd. 30 (Berkeley, CA).

CHIR-12.12 do lote de DS foi utilizado nas seguintes formulações:

5 **Formulação 1:** 20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 80 a 0,1% e pH 5,5

Formulação 2: 20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, L-arginina-HCl 150 mM, Tween 80 a 0,1% e pH 5,5

Métodos Analíticos

10 **Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).**

A estabilidade de conformação das amostras da formulação de CHIR-12.12 foram avaliadas utilizando-se um MicroCal VP-DSC sob aquecimento de 15°C a 90°C a 1°C/minuto.

15 **Cromatografia de Exclusão por Tamanho (SEC-HPLC)**

Pureza, agregação e fragmentação de CHIR-12.12 foram analisados por um RPLC Waters Alliance com uma coluna Tosohas TSK-GEL 3000SW_{XL}, sódio 50 mM, fosfato, NaCl 200 mM, pH 7,0 como fase móvel a uma taxa de fluxo de 0,7 mL/minuto.

SDS-PAGE (Não reduzida e Reduzida).

A pureza de CHIR-12.12 foi também avaliada utilizando-se géis de tris-glicina a 12% sob condições de não redução e de redução. A proteína foi detectada por tingimento azul de Coomassie.

Cromatografia de Troca Catiônica (CIEX-HPLC).

A desaminação relacionada à mudança de carga de CHIR-12.12 foi pedida utilizando-se um sistema HPLC Waters Alliance com uma coluna Dionex Propac WCX-10, HEPES 50 mM, pH 7,3 como fase móvel A e HEPES 50 mM contendo NaCl 500

mM, pH 7,3 como fase móvel B a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/minuto.

O que segue é uma chave para as abreviações nas figuras referidas na seção de resultados aqui abaixo:

Succinato, NaCl, TW80 = tampão succinato de sódio/ácido succínico 10 mM, NaCl 150 mM,
Tween 80 a 0,1%, pH 5,5

Citrato, NaCl, 0,1% > = tampão citrato de sódio/ácido
TW80 cítrico 10 mM, NaCl 150 mM,
Tween 80 a 0,1%, pH 5.5

Acetata, NaCl, 0,1% > = tampão acetato de sódio/ácido
TW80 acético, NaCl 150 mM, Tween 80
a 0,1%, pH 5,5

Fos, NaCl, 0,1% > TW80 = tampão fosfato de sódio
dibásico/ fosfato de sódio
monobásico 10 mM, NaCl 150 mM,
Tween 80 a 0,1%, pH 5,5

Citrato, Arg, 0,1% > = tampão citrato de sódio/ácido
TW80 cítrico 10 mM, L-arg NaCl 150
mM, Tween 80 a 0,1%, pH 5,5

5 Resultados

Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

A Figura 7 mostra termogramas DSC para CHIR-12.12 nas duas formulações conforme descrito na seção "Materiais" acima. O desdobramento térmico de CHIR-12.12 exibiu pelo 10 menos duas transições térmicas, provavelmente representando desdobramento/fusão dos domínios Fab e Fc, respectivamente. A uma temperatura mais alta, as proteínas presumivelmente agregaram, resultando em perda de sinal de DSC. Neste estudo, a temperatura de transição térmica mais baixa foi

definida como a temperatura de fusão, T_m . A formulação contendo L-arginina-HCl exibiu uma T_m superior à formulação contendo NaCl, sugerindo que a L-arginina-HCl fornece CHIR-12.12 com uma estabilidade de conformação superior à do NaCl.

Análise SEC-HPLC.

Após incubação a 5°C por 6 meses, o SEC-HPLC detectou quantidades desprezíveis de agregados de proteína e fragmentos (< 0,5%) nas formulações contendo L-arginina-HCl e NaCl e nenhuma diferença de estabilidade entre as duas formulações (dados não mostrados). Sob condições de armazenamento aceleradas, isto é, 25°C por 6 meses, a formulação contendo L-arginina-HCl continha um percentual mais alto de monômero, conforme mostrado na Figura 8. Às custas do monômero, o conteúdo de agregados e fragmentos lentamente aumenta com o tempo de armazenamento. Entretanto, a formulação contendo L-arginina-HCl gerou menos agregados e fragmentos do que a formulação contendo NaCl conforme mostrado na Figura 9 e 10, respectivamente. De forma similar, quando armazenada a 40°C, a formulação contendo L-arginina-HCl exibiu um percentual mais alto de monômero e percentuais menores de agregados e fragmentos que a formulação contendo NaCl, conforme mostrado nas Figuras 11, 12 e 13, respectivamente. Sob armazenamento a 40°C por 4 meses, a formulação contendo L-arginina-HCl possuía 91,8% de monômero restante, 1,7% de agregados e 6,5% de fragmentos, enquanto a formulação contendo NaCl possuía 87,9% de monômero, 2,2% de agregados e 9,9% de fragmentos. Os resultados de SEC-HPLC demonstram que L-arginina-HCl melhora a estabilidade da proteína CHIR-12.12

em comparação ao NaCl.

SDS-PAGE (Não reduzida e Reduzida).

A Tabela 3 apresenta resultados de SDS-PAGE para as formulações contendo L-arginina-HCl e NaCl analisadas sob condições não reduzidas (MR) e reduzidas (R). A pureza de CHIR-12.12 foi medida como um percentual da banda principal sob condições não reduzidas ou como um percentual da soma das bandas das cadeias pesada e leve sob condições reduzidas. Exceto no tempo 0, a formulação contendo L-arginina-HCl mostrou pureza mais alta que a formulação contendo NaCl tanto sobre condições não reduzidas quanto reduzidas. A observação do SEC-HPLC foi consistente com os resultados do SEC-HPLC onde a L-arginina-HCl aumentou a estabilidade da proteína CHIR-12.12 em comparação ao NaCl.

15 **Tabela 3.** Comparação de análise de L-arginina-HCl e NaCl por SDS-PAGE.

Formulação com 20 mg/mL de CHIR-12.12	T=0		4 meses a 25 °C		4 meses a 40 °C		6 meses a 25 °C	
	R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
	% H+L	% Principa l	% H+L	% Princi pal	% H+L	% Princip al	% H+L	% Princ ipal
Citrato, NaCl, Tween 80 0,1%, pH 5,5	98,6	85,0	97,2	82,5	91,1	72,1	96, 6	76,2
Citrato, L-arg- HCl, Tween 80 0,1%, pH 5,5	98,8	85,0	97,4	83,1	91,3	76,2	97, 6	78,9

Análise CIEX-HPLC.

O CIEX-HPLC separa as moléculas com base na carga de forma que as variantes ácidas eluem antes da espécie de pico principal e as variantes básicas eluem após a espécie de pico principal. A pureza de CHIR-12.12 e seu conteúdo de 5 produtos de desaminação foram medidos como percentuais do pico principal e percentual de variantes ácidas, respectivamente.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram a pureza, o conteúdo de produto de desaminação e o conteúdo de variantes básicas, 10 respectivamente, nas duas formulações. No tempo 0, as duas formulações possuíam 68,6% de pureza e 15,5% de produto de desaminação assim como 15,9% de variantes básicas. Quando armazenadas a 25°C, a formulação contendo L-arginina-HCl permaneceu em pureza mais alta e a conteúdo de variantes 15 básicas mais alto e exibiu um percentual mais baixo de produtos de desaminação que a formulação contendo NaCl. Sob armazenamento a 25°C por 6 meses, a formulação contendo L-arginina-HCl possuía 47,3 % de pureza, 12,5 % de variantes básicas e 40,0 % de produto de desaminação gerado, enquanto 20 a formulação contendo NaCl possuía 45,6 % de pureza, 11,7% de variantes básicas e 42,7 % de produto de desaminação. Embora as formulações contendo L-arginina-HCl e NaCl tenham mostrado pouca mudança ao longo de 6 meses de armazenamento a 5°C, os resultados de CIEX-HPLC sob condições de 25 armazenamento aceleradas (25°C) previram que a L-arginina-HCl será provavelmente superior ao NaCl em melhorar a estabilidade de CHIR-12.12 contra desaminação em tempo real a longo prazo.

Em resumo, este estudo mostra que L-arginina-HCl 150 30 mM não apenas fornece isotonicidade à formulação líquida de

CHIR-12.12, mas também aumenta a estabilidade de conformação de CHIR-12.12 contra agregação, fragmento de ligação ao antígeno deste e desaminação. A L-arginina-HCl é superior ao NaCl sob condições de estabilidade aceleradas, 5 e os dados de estabilidade acelerada ainda predizem uma vida útil sob armazenamento mais longa para a formulação de CHIR-12.12 com L-arginina-HCl.

Exemplo 3: Efeitos de Tween 80 e Tween 20 em Minimizar a Agregação de Substância de Droga de Volume de CHIR-12.12 a Partir de Armazenamento Congelado

Armazenamento congelado de substância de droga de volume de CHIR-12.12 é preferida sobre armazenamento líquido por diversas razões, incluindo estabilidade e vida útil de armazenamento aumentada do produto, crescimento 15 microbial reduzido, assim como eliminação de espumação durante o transporte. Entretanto, congelar e subseqüentemente descongelar com induzir a stress na solução de proteína introduzindo interfaces gelo-líquido e gradientes de concentração de solutos. Os estresses podem 20 desnaturar as proteínas e levar a agregação e, em casos piores, a formação de particulados ou precipitados visíveis. À medida que os agregados de proteína têm sido freqüentemente associados a potência de droga reduzida e imunogenicidade aumentada, minimizar a agregação e otimizar 25 os componentes da formulação de proteína e condições de congelamento-descongelamento é muito crítico.

Excipientes de formulação, como açúcares, álcoois polihídricos, aminoácidos e tensoativos podem possivelmente estabilizar as proteínas e anticorpos da agregação. Em um 30 estudo de anticorpo monoclonal, descobriu-se que alguns

açúcares comumente utilizados, álcoois polihídricos e aminoácidos são mais efetivos que tensoativos na redução de agregação disparada por congelamento-descongelamento. Entretanto, estudos com CHIR-12.12 mostram que o uso de 5 açúcar (por exemplo, trihalose), um álcool polihídrico (por exemplo, sorbitol) ou um aminoácido (por exemplo glicina) sozinho não reduzem de forma significativa a agregação de CHIR-12.12 durante congelamento e descongelamento.

Este estudo focalizou em abordagens de formulação para 10 minimizar a agregação de CHIR-12.12 durante o congelamento e descongelamento. Desta maneira, vários tensoativos foram avaliados a fim de minimizara agregação induzida por congelamento e descongelamento de CHIR-12.12. Embora seja improvável que a substância de droga de CHIR-12.12 15 congelada experimentasse múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento conforme avaliado neste estudo, estudos de stress de congelamento e descongelamento extensivos são avaliações do pior dos casos, utilizados para prever se o potencial para a droga de volume formulada agregar se 20 multiplicaria se múltiplos congelamentos e descongelamentos ocorressem inadvertidamente durante armazenamento de longo prazo e transporte.

Materiais:

Lotes de volume de CHIR-12.12 # UA7870, # TC23-2, # UB 25 1291, # PD010705A, e #CD083005A foram utilizados para este estudo. Tween 80, Tween 20, Brij 35 e Pluronic F68 foram adquiridos de Sigma, J.T. Baker, Alfa Aesar, e MediaTech Cellgro, respectivamente. A garrafa de policarbonato (PC) para armazenamento congelado da substância de droga de 30 CHIR-12.12 foi adquirida de Nalgene.

Métodos:

Exceto pelas amostras de controle, todas as outras amostras foram submetidas a congelamento completo a -20°C ou -60°C seguido por completo descongelamento à temperatura ambiente por múltiplos ciclos.

Três métodos analíticos foram empregados para detectar a proteína CHIR-12.12 variando de monômero a agregados visíveis. Observação visual foi executada sob luz Tyndal (M.W. Technologies, Inc.) para detecção de particulados visíveis. Um Sistema de Contagem de Partícula Líquida (HIAC/Royco) foi utilizado para contar agregados subvisíveis $\geq 10 \mu\text{m}$ e $\geq 25 \mu\text{m}$. Um Analisador de Dispersão de Luz Dinâmico (Malvern Nano Series) foi empregado para determinar diâmetros hidrodinâmicos de monômeros e agregados e a distribuição de tamanho de partícula.

Avaliação de Partículas Visíveis

As amostras para o estudo de congelamento e descongelamento foram preparadas a partir do lote de substância de droga de CHIR-12.12 #UA7870 e lote # TC23-2. Todas as amostras foram formuladas em solução de tampão de citrato de sódio/acido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM e pH 5,5 por diálise, seguido pela adição de percentuais variáveis (0 a 0,5% p/v) de um dos seguintes tensoativos não iônicos: Tween 80, Tween 20, Brij 35 e Pluronic F68. Cada amostra de 2,5 mL foi preenchida em frascos de vidro e submetidas a congelamento durante a noite a -60°C e completo descongelamento à temperatura ambiente por até oito ciclos. As amostras no tempo inicial (tempo 0) e após cada ciclo de congelamento e descongelamento foram examinadas visualmente quanto a limpidez e precipitados/agregados visíveis.

Contagem de Partículas Sub-Visíveis.

Os lotes de substância de droga de CHIR-12.12 # UB 1291 e # PD010705A foram formulados na solução (20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, a pH 5,5), seguido pela adição de 0% a 0,5% (p/v) de Tween 80 ou Tween 20. Aliquotas de amostras de formulação de 20 mL foram preenchidas em garrafas de policarbonato de 125 cm³ e submetidas a congelamento a -60°C e descongelamento à temperatura ambiente. Após cinco ciclos de congelamento/descongelamento, as amostras foram medidas quando a agregados sub-visíveis ≥ 10 µm e ≥ 25 µm utilizando um Sistema de Contagem de Partícula Líquida Hiac-Royco.

Análise de Dispersão de Luz Dinâmica.

Antes e depois de 5 ciclos de congelamento/descongelamento, as formulações (20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, L-arginina-HCl 150 mM, L-metionina 5 mM, Tween 20 a 0% a 0,2% e pH 5,5) foram avaliadas quanto a agregados utilizando-se um Analisador de Dispersão de Luz Dinâmica.

A espectroscopia de Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) calcula o diâmetro hidrodinâmico de partículas incluindo monômero e agregados do coeficiente de difusão medido das partículas utilizando a equação de Stokes-Einstein e assumindo que as partículas são esféricas. Os números de espécies agregadas e polidispersidade são também obtidos a partir de estudos de DLS.

Resultados

Avaliação de Partículas Visíveis

A Tabela 4 resume os resultados da observação visual.

No tempo 0, que foi antes do início dos ciclos de congelamento e descongelamento, todas as amostras estavam ligeiramente opalescentes sem agregados/precipitados visíveis. Após um ciclo de congelamento e descongelamento, 5 alguns agregados/precipitados visíveis se formaram em todas as formulações sem qualquer tensoativo adicionado e nas formulações contendo de 0% a 0,5% (p/v) de Tween 80 e nas formulações contendo de 0 a 0,1% (p/v) de Brij 35 assim como nas amostras contendo de 0% a 0,5% (p/v) de Pluronic 10 F68. As amostras contendo de 0,05% a 0,5% (p/v) de Tween 20 não mostraram qualquer agregado ou precipitado por todos os oito ciclos de congelamento e descongelamento. Isto sugere 15 que Tween 20 é mais efetivo que Tween 80 em evitar a formação de agregados insolúveis grandes a partir de múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento. Brij 35 e Pluronic F68 foram muito menos efetivos que Tween 80 e Tween 20.

Tabela 4. Aspecto visual de CHIR-12.12 nas formulações tamponadas com citrato com concentrações variáveis de 20 tensoativo.

Formulação de 20 mg/mL CHIR-12.12, Citrato/Ácido Cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 80, pH 5,5							
Conc. de Tween 80 (p/v)	T=0	1XFT*	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, algum ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0,05%	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt

0,10%	SO	SO	SO	SO, a few	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,20%	SO	SO	SO	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,50%	SO	SO	SO	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt

Formulação de 20 mg/mL CHIR-12.12, Citrato/Ácido Cítrico 10

mM, NaCl 150 mM, Tween 20, pH 5,5

Conc. de Tween 20 (p/v)	T=0	1XFT	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0,01%	SO	SO	SO	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, ppt
0,05%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0,10%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0,20%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO
0,50%	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO

Formulação de 20 mg/mL CHIR-12.12, Citrato/Ácido Cítrico 10

mM, NaCl 150 mM, Brij 35, pH 5,5

Conc. de Brij 35	T=0	1XFT	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
------------------	-----	------	------	------	------	------	------

(p/v)							
0%	SO	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0,01%	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,10%	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,20%	SO	SO	SO	SO	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,50%	SO	SO	SO	SO	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt

Formulação de 20 mg/mL CHIR-12.12, Citrato/Ácido Cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, Pluronic F680, pH 5,5

Conc. de Plur. F68 (p/v)	T=0	1XFT	2XFT	4XFT	5XFT	6XFT	8XFT
0%	SO	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt	SO, ppt
0,01%	SO	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,10%	SO	SO,	SO,	SO,	SO,	SO, algum	SO,

		algu m ppt	algum ppt	algum ppt	algum ppt	ppt	algum ppt
0,20%	SO	SO, algu m ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt
0,50%	SO	SO, algu m ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt	SO, algum ppt

Legendas: XFT= N° de ciclos de congelamento/descongelamento; SO = ligeiramente opalescente; ppt = precipitado/agregado

Contagem de Partículas Sub-Visíveis.

A Tabela 5 mostra as contagens de agregados sub-visíveis por mL de formulações tamponadas com citrato/acido cítrico contendo concentrações variáveis de Tween 80. Uma tendência decrescente nas contagens de partículas sub-visíveis foi observada à medida que a concentração de Tween 80 aumentava; a redução nas contagens de partículas sub-visíveis era modesta quando Tween 80 estava acima de 0,1% (p/v), sugerindo que a concentração apropriada para uso de Tween 80 fosse de 0,1% a 0,2% (p/v).

Tabela 5. Contagens de partícula sub-visível nas formulações contendo 20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/acido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM e concentrações variáveis (0% a 0,2% p/v) de Tween 80 a pH 5,5.

Concentração de Tween 80 (p/v)	Contagens de Partícula Sub-
--------------------------------	-----------------------------

Visível /mL após 5 ciclos de

	congelamento e descongelamento	
	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
0% de Tween 80	1.439	23
0,05% de Tween 80	148	3
0,10% de Tween 80	44	1
0,20% de Tween 80	39	1

A Tabela 6 mostra as contagens de agregados sub-visíveis por mL de formulações tamponadas com citrato/acido cítrico com ou sem Tween 20. As contagens de agregados foram enormemente reduzidas com a adição de Tween 20 na formulação. Quando o Tween era de 0,05% (p/v) e superior, a redução nas contagens de agregados sub-visíveis quase atingiu um platô, sugerindo que a concentração apropriada de Tween 20 fosse em torno de 0,05% a 0,2% (p/v).

Tabela 6. Contagens de partícula sub-visível nas formulações contendo 20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/acido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM e concentrações variáveis (0% a 0,2% p/v) de Tween 20 a pH 5,5.

Concentração de Tween 20 (p/v)	Contagens de Partícula Sub-Visível /mL após 5 ciclos de congelamento e descongelamento	
	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
0% de Tween 20	1.671	41
0,01% de Tween 20	46	2
0,05% de Tween 20	32	3
0,1% de Tween 20	11	1
0,2% de Tween 20	25	1

Adicionalmente, As Tabelas 5 e 6 mostram que formulações contendo Tween 80 e Tween 20 geraram muito

poucos agregados $\geq 25 \mu\text{m}$, e a formulação contendo Tween 20 gerou menos agregados $\geq 10 \mu\text{m}$ que a formulação contendo Tween 80 após 5 ciclos de congelamento e descongelamento. Os resultados indicam que Tween 20 é mais efetivo que Tween 5 80 em minimizar a formação de agregados sub-visíveis na formulação tamponada com citrato/ácido cítrico de CHIR-12.12.

Com base nos resultados das Tabelas 4, 5 e 6, Tween 20 representa um excipiente preferido sobre Tween 80 para 10 minimizar a formação de agregados em formulações de CHIR-12.12. Desta forma, estudos adicionais foram conduzidos para otimizar adicionalmente as concentrações de Tween 20 necessárias para prevenir a formação de agregados em formulações de CHIR-12.12. As formulações (20 mg/mL de 15 CHIR-12.12, citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, L-arginina-HCl 150 mM, L-metionina 5 mM, Tween 20 de 0% a 0,2% e pH 5,5) foram preparadas a partir de substância de droga de CHIR-12.12 de lote # CD083005A. 20 mL de amostras da formulação foram preenchidas em garrafas de 20 policarbonato de 125 cm³ e submetidas a congelamento a -20°C e descongelamento à temperatura ambiente. Antes e depois de cinco ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras da formulação foram medidas quanto a contagens de partículas sub-visíveis utilizando um contador de 25 partícula líquida HIAC-Royco. Os resultados estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7. Contagens de partícula sub-visível nas formulações contendo 20 mg/mL de CHIR-12.12, citrato de sódio/ácido cítrico 10 mM, L-arginina-HCl 150 mM, L-metionina 5 mM, Tween 20 de 0% a 0,2%, a pH 5,5.

Concentração de Tween 20 (p/v)	Contagens de Particula /mL \geq 10 μm		Contagens de Particula /mL \geq 25 μm	
	Antes de FT	Após 5XFT*	Antes de FT	Apóst 5XFT
0% de Tween 20	23	169	7	5
0,005% de Tween 20	4	24	0	2
0,025% de Tween 20	5	6	1	1
0,05% de Tween 20	2	9	0	1
0,1% de Tween 20	6	7	1	1
0,2% de Tween 20	10	64	1	5

*Legenda: XFT = N° de ciclos de congelamento e descongelamento.

Após cinco ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras contendo L-arginina-HCl e L-metionina geraram 5 muito menos agregados que as formulações sem L-arginina-HCl e L-metionina, isto é, 169 partículas / mL \geq 10 μm contra 1.439 ou 1.671 partículas / mL \geq 10 μm na ausência de Tween 20 (ver Tabelas 6 e 7). Entretanto, até que Tween 20 fosse introduzido, L-arginina-HCl e L-metionina não reduziram 10 significativamente os agregados induzidos por congelamento e descongelamento a um nível mínimo. Isto sugere que a L-arginina-HCl e L-metionina não são suficientemente eficientes em minimizar agregação de CHIR-12.12 induzida por congelamento e descongelamento.

15 A partir dos dados resumidos nas Tabelas 5 a 7, as contagens de agregados sub-visíveis de amostra congelamento e descongelamento contendo de 0,025% a 0,1% (p/v) de Tween 20 permaneceram comparáveis às suas amostras respectivas antes dos ciclos de congelamento e descongelamento. Isto

indica que as formulações contendo Tween 20 em combinação com L-arginina-HCl e L-metionina geraram um mínimo de agregados sub-visíveis. Assim, Tween 20 é o excipiente na formulação que efetivamente minimiza a geração de agregados 5 sub-visíveis de CHIR-12.12 durante congelamento e descongelamento. A concentração efetiva de Tween 20 foi determinada como sendo de 0,025% a 0,1% (p/v).

Análise de Dispersão de Luz Dinâmica.

A Tabela 8 mostra o diâmetro hidrodinâmico médio das 10 partículas, polidispersidade e percentual de intensidade da espécie de monômero de CHIR-12.12. A análise de Dispersão de Luz Dinâmica detectou apenas espécie de monômero em todas as amostras antes e depois de cinco ciclos de congelamento e descongelamento, conforme mostrado por 100% 15 de intensidade da espécie de monômero. Isto sugere que todas as amostras foram compostas principalmente de monômeros. Após 5 ciclos de estudos de congelamento e descongelamento, alguns agregados (possivelmente dímeros e trímeros) podem coexistir com o monômero nas amostras sem 20 Tween 20 e com 0,005% (p/v) de Tween 20, conforme mostrado pelos aumentos no diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade. As amostras que continham de 0,025% a 25 0,1% (p/v) de Tween 20 mostraram pouca mudança em valores de diâmetro hidrodinâmico e polidispersidade, indicando que se mantiveram nos níveis anteriores de monômeros sem formação de agregados notável.

Tabela 8. Análise de Dispersão de Luz Dinâmica de CHIR-12.12 antes e depois de 5 ciclos de congelamento e descongelamento da formulação contendo 20 mg/mL de CHIR-30 12.12, citrato de sódio/acido cítrico 10 mM, L-arginina-HCl

150 mM, L-metionina 5 mM, e concentrações variáveis de Tween 20 (0% a 0,2%), a pH 5,5.

Concentração de Tween 20 (p/v)	Diâmetro Hidrodinâmico Médio (mm)		Polidispersida de		% de Intensidade de Espécies de Monômero	
	Antes de FT*	Após 5XFT*	Antes de FT	Após 5XFT	Antes de FT	Após 5XFT
0% de Tween 20	12,2	12,4	0,047	0,055	100,0	100,0
0,005% de Tween 20	12,2	12,4	0,045	0,045	100,0	100,0
0,025% de Tween 20	12,3	12,4	0,035	0,034	100,0	100,0
0,05% de Tween 20	12,3	12,2	0,035	0,031	100,0	100,0
0,1% de Tween 20	12,4	12,4	0,035	0,039	100,0	100,0
0,2% de Tween 20	12,3	12,2	0,036	0,043	100,0	100,0

*Legenda: FT = congelamento e descongelamento; XFT = N° de ciclos de congelamento e descongelamento.

5 Com base na observação visual, contagens de partícula sub-visíveis e a análise de Dispersão de Luz Dinâmica, a concentração ideal de Tween 20 foi determinada como sendo de 0,025% a 0,1% (p/v) para minimizar a agregação de CHIR-12.12 induzida por congelamento e descongelamento.

10 Em resumo, descobriu-se que tanto Tween 20 quanto Tween 80 minimizam a agregação de CHIR-12.12 durante congelamento e descongelamento. As concentrações ideais de

Tween 20 e Tween 80 são de 0,025% a 0,1% (p/v) e 0,1% a 0,2% (p/v), respectivamente. Tween 20 é mais efetivo que Tween 80, em que uma concentração mais baixa de Tween 20 reduz o número e extensão da formação de agregados a um nível mais baixo. Este estudo demonstrou que a adição de uma concentração ideal de Tween, preferivelmente em combinação com L-arginina-HCl e L-metionina, possibilita o armazenamento de substância de droga de volume de CHIR-12.12 tamponada por citrato/ácido cítrico a -20°C ou abaixo sem agregação significativa.

Exemplo 4: Ensaios para Atividade Antagonista e Anticorpos Anti-CD40

Os seguintes ensaios podem ser utilizados para avaliar a atividade antagonista de um anticorpo anti-CD40. Células B humanas para este ensaio podem ser obtidas, por exemplo, por isolamento a partir de amídalas obtidas de indivíduos submetidos a amigdalectomia, essencialmente conforme descrito em De Groot e outros, (1990) *Lymphokine Research* (1990) 9:321. De forma resumida, o tecido é disperso com bisturis, células fagocíticas e NK são removidas por tratamento com éster metílico de L-leucina e células T são removidas por um ciclo de "rosetting" com eritrócitos de ovelha (SRBC) tratados com brometo de 2-aminoetil isotiorônio. A pureza das preparações de linfócito B resultantes pode ser verificada por marcação de imunofluorescência indireta com anti(CD20) mAb B1 (Coulter Clone, Hialeah, FA) ou (CD3) mAb OKT3 (Ortho, Raritan, NJ) e um fragmento de F(ab')2 conjugado com FITC de coelho anti-(Ig de camundongo) (Zymed, San Francisco, CA) e análise FACS.

Ensaio de Proliferação de Célula B

Células B (4×10^4 por cavidade) são colocadas em cultura em 200 μL de suplemento IMDM com 10% de soro fetal de bezerro em placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano. As células B são estimuladas pela adição de anticorpos anti-(IgM) immobilizadas (Immunobeads; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; BioRad, Richmond, California). Quando desejado, 100 U/ mL de IL-2 recombinante é adicionado. Concentrações variáveis de anticorpos monoclonais de teste (mAbs) são adicionados no começo das microculturas e a proliferação é avaliada no dia 3 medindo-se a incorporação de [^3H]timidina após 18 horas de pulsação.

Um anticorpo anti-CD40 antagonista não co-estimula de forma significativa a proliferação de célula B humana na presença de anti-IgM immobilizado ou na presença de anti-IgM immobilizado e IL-2.

Ensaio de Proliferação de Célula B Tipo Banchereau

Para testar a capacidade de anticorpos monoclonais anti-CD40 estimularem a proliferação de células B em um sistema de cultura análogo àquele descrito por Banchereau e outros, (1991) *Science* (1991) 251:70, células transfectantes 3T6 de camundongo expressando a forma alélica HR de Fc γ RII são utilizadas. Células B (2×10^4 por cavidade) são colocadas em cultura em microcavidades de fundo plano na presença de 1×10^4 células transfectantes (irradiadas com 5.000 Rad) em 200 μL de IMDM suplementado com 10% de soro de fetal de bezerro e 100 U/ mL de IL-4 recombinante. Antes da adição de células B, as células 3T6 são deixadas para aderirem ao plástico de cultura por pelo menos 5 horas. mAbs anti-CD40 são adicionados em

concentrações variando de 10 ng/mL a 2.000 ng/mL e a proliferação de células B é avaliada medindo-se a incorporação de timidina no dia 7, sob 18 horas de pulsação com [³H]timidina.

5 **Inibição de Proliferação de Célula B estimulada por S2C6 Usando mAbs Anti-CD40 Antagonista.**

Anticorpos monoclonais anti-CD40 antagonistas (mAbs) podem ser também caracterizados por sua capacidade de inibir o estímulo de proliferação de célula B por um anticorpo anti-CD40 como S2C6 (também conhecido como SGN-14, que é conhecidamente um agonista CD40 de estímulo de proliferação de células B normais; Francisco e outros, (2000) *Cancer Res.* 60:3225-3231) utilizando o Ensaio de Proliferação de Célula B descrito acima. Células B tonsilares humanas (4×10^4 por cavidade) são colocadas em cultura em microcavidades de 200 µL na presença de anti-IgM acoplados a grânulos de Sefarose (5 µg/mL) e mAb anti-CD40 S2C6 (1,25 µg/mL). Concentrações variáveis de um mAb anti-CD40 de interesse são adicionadas e a incorporação de [³H]timidina é avaliada após 3 dias. Como um controle, pode-se adicionar mAb anti-(glucocerebrosidase) 8E4 em concentrações similares. Barneveld e outros, (1983) *Eur. J. Biochem.* 134:585. Um anticorpo anti-CD40 antagonista pode inibir a co-estimulação de proliferação de célula B humana induzida por anti-IgM por S2C6, por exemplo, em pelo menos 75% ou mais (isto é, a proliferação estimulada por S2C6 na presença de um anticorpo anti-CD40 antagonista não é superior a 25% daquela observada na ausência do anticorpo anti-CD40 antagonista). Em contrapartida, nenhuma inibição significativa seria vista com quantidades equivalentes de

mAb 8E4 não relevante, direcionado a β -glucocerebrosidase. Barneveld e outros, supra. Tal resultado indicaria que os mAbs anti-CD40 não fornecem sinais estimulantes para a proliferação de células B humanas mas, de forma oposta, 5 podem inibir os sinais estimulantes exercidos acionando-se CD40 com outro mAb.

Ensaio de Ativação de Célula B com Células EL4B5.

Zubler e outros, (1985) *J. Immunol.* (1985) 134:3662, observou que um sub-clone mutante do linha de EL-4 de 10 timoma de camundongo, conhecida como EL4B5, poderia estimular fortemente células B de origem murina e humana para se proliferarem e diferenciarem em células de plasma secretando imunoglobulina *in vitro*. Descobriu-se que esta ativação é independente de antígeno e não restrita por MHC. 15 Para estímulo ideal de células humanas, a presença de sobrenadante de células T humanas ativadas foi necessária mas uma resposta de célula B também ocorreu quando células EL4B5 foram pré-ativadas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) ou IL-1. Zubler e outros, (1987) *Immunological Reviews* 99:281; e Zhang e outros, (1990) *J. Immunol.* 20 144:2955. A ativação de células B neste sistema de cultura é eficiente - experimentos de limitação de diluição mostraram que a maioria das células B humanas pode ser ativada para se proliferarem e se diferenciarem em células 25 secretando anticorpo. Wen e outros, (1987) *Eur. J. Immunol.* 17:887.

As células B (1.000 por cavidade) são colocadas em cultura juntas com células EL4B5 (5×10^4 por cavidade) irradiadas (5.000 Rad) em placas de microtitulação de fundo 30 plano em 200 μL de IMDM suplementados com 10% de soro fetal

de bezerro desativado por calor, 5 ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (Sigma) e 5% de sobrenadante de célula T humana. São adicionados mAbs em concentrações variáveis no início das culturas e a incorporação de timidina é 5 avaliada no dia 6 após 18 horas de pulsação com [³H]timidina. Para a preparação de sobrenadante de célula T, células T purificadas são colocadas em cultura a uma densidade de 10⁶/mL por 36 horas na presença de 1 µg/mL de PHA e 10 ng/mL de PMA. Wen e outros, (1987) *Eur. J. Immunol.* (1987) 17:887. O sobrenadante de célula T é obtido centrifugando-se as células e armazenando-as a -20°C. A eficácia de sobrenadantes de células T em melhorar a proliferação de células B humanas em culturas de célula EL4B5 é testada e os sobrenadantes mais efetivos são unidos 10 para uso em experimentos. Ao se avaliar o efeito de um 15 antícorpo anti-CD40 em proliferação de célula B humana induzida por EL4B5, um antícorpo monoclonal como MOPC-141 (IgG2b) pode ser adicionado como um controle.

Um antícorpo anti-CD40 antagonista pode inibir a 20 proliferação de célula B estimulada por linha celular EL4B5, por exemplo, em pelo menos 75% ou mais (isto é, a proliferação celular induzida por EL4B5 na presença de um 25% antícorpo anti-CD40 antagonista não é superior a daquela observada na ausência do antícorpo anti-CD40 antagonista). Em contrapartida, um antícorpo de controle como MOPC-141 não possuiria qualquer efeito significativo na proliferação de célula B induzida por EL4B5.

Ensaio de Ajudante de Célula T Humana para Produção de Antícorpo por Células B.

30 Um antícorpo anti-CD40 antagonista pode funcionar

como um antagonista de produção de imunoglobulina por células B. Um anticorpo anti-CD40 pode ser testado para este tipo de atividade antagonista avaliando-se a capacidade do anticorpo de inibir a produção de imunoglobulina por células B que foram estimuladas de maneira dependente de contato com células T ativadas em um ensaio de ajudante de célula T. Desta forma, placas de cultura de tecido de 96 cavidades são revestidas com uma diluição de 1:500 de fluido de ascites de mAb anti-CD3 CLB-T3/3 (CLB, Amsterdã, Holanda). Conforme indicado, mAbs co-estimulantes são adicionados: mAbs anti-CD2 CLB_T11.1/1 e CLB-T11.2/1 (CLB, Amsterdã, Holanda), ambas as ascites 1:1000 e mAb anti-CD28 CLB-28/1 (CLB, Amsterdã, Holanda). Subseqüentemente, células T tonsilares (irradiadas, 3.000 Rad; 10^5 por cavidade), células B tonsilares (10^4 por cavidade), e rIL-2 (20 U/mL) são adicionadas. O volume final da cada cultura de célula é de 200 μ L. Após 8 dias, as células estão voltadas para baixo e um sobrenadante livre de células é colhido. As concentrações de IgM e IgG humanos em amostras (diluídas) é estimado por ELISA conforme descrito abaixo.

Em uma modalidade, células tonsilares humanas (10^4 /cavidade) são colocadas em cultura juntas com células T purificadas irradiadas (3.000 Rad, 10^5 /cavidade) em placas de 96 cavidades, revestidas com mAb anti-CD3 e com ou sem mAbs diferentes para co-estimular as células T. Após 8 dias de cultura os sobrenadantes são colhidos para a determinação de produção de imunoglobulina pelas células B. A produção de imunoglobulina pelas células B é avaliada pelo ensaio ELISA descrito abaixo. O anticorpo anti-CD40 de

interesse é adicionado em concentrações variáveis a partir do início das culturas. Como um controle, mAb MOPC-141 pode ser adicionado.

Um anticorpo anti-CD40 antagonista pode inibir 5 produção de anticorpo IgG e IgM de células B, estimulada por células T humanas em pelo menos 50% ou mais (isto é, a produção de anticorpo induzida por célula T por células B na presença de um anticorpo anti-CD40 antagonista não é de mais de 50% daquela observada na ausência do anticorpo 10 anti-CD40 antagonista). Em contrapartida, um anticorpo de controle como MOPC-141 não possuiria qualquer efeito significativo na produção de anticorpo por células B induzida por células T.

Ensaio ELISA para Quantificação de Imunoglobulina.

As concentrações de IgM e IgG humanos são estimadas 15 por ELISA. Placas de ELISA de 96 cavidades são revestidas com 4 µg/mL de IgG anti-humano de camundongo mAb MH 16-01 (CLB, Amsterdã, Holanda) ou com 1,2 µg/mL de IgM anti-humano de camundongo mAb 4102 (Tago, Burlingame, CA) em tampão 20 carbonato 0,05 M (pH = 9,6), incubando-se por 16 h a 4°C. As placas são lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-Tween) e saturadas com BSA por 1 hora. Após 2 lavagens as placas são incubadas por 1 h a 37°C com diluições diferentes das amostras de teste. Após 3 lavagens, 25 imunoglobulina ligado é detectado incubando-se por 1 h a 37°C com 1 µg/mL de IgG anti-humano mAb MH 16-01 (CLB) de camundongo marcado por peroxidase ou IgM anti-humano mAb MH 15-01 (CLB) de camundongo. As placas são lavadas 4 vezes e a atividade de peroxidase ligada é revelada pela adição de 30 O-fenilenodiamina como um substrato. Soro padrão humano

(H00, CLB) é utilizado para estabelecer uma curva padrão para cada ensaio.

Os artigos "um/uns" e "uma/umas" são aqui utilizados para se referirem a um ou mais de um (isto é, a pelo menos 5 um) dos objetos gramaticais do artigo. Por meio de exemplo, "um elemento" significa um ou mais deste elemento.

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados na especificação são indicativos do nível daqueles habilitados na técnica a qual esta invenção pertence. Todas 10 as publicações e pedidos de patente estão aqui incorporados para referência na mesma medida como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicada para ser incorporada para referência.

15 Embora a invenção acima tenha sido descrita em alguns detalhes por meio de ilustração e exemplos para propósitos de clareza de compreensão, será óbvio que certas mudanças e modificações podem ser praticadas dentro do escopo das reivindicações em anexo.

Listagem de Seqüência

<110> Lu, Xiaofeng

Chen, Bao-Lu

5 Araya, Kidisti

Okhamafe, Augustus

<120> Composições Farmacêuticas De Anticorpo Anti-Cd40
Antagonista

10

<130> PP028228.0002 (325023)

<150> 60/794,011

<151> 21/04/2006

15

<160> 12

<170> FastSEQ para versão de Windows 4.0

20 <210> 1

<211> 720

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

25 <220>

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

<221> CDS

30 <222> (1)...(720)

<400> 1
atg gcg ctc cct gct cag ctc ctg ggg ctg cta atg ctc tgg gtc tct
48
5 Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

gga tcc agt ggg gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg acc
96
10 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
20 25 30

gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tcc agt cag agc
144
15 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
35 40 45

ctc ctg tat agt aat gga tac aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag
192
20 Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

cca ggg cag tct cca cag gtc ctg atc tct ttg ggt tct aat cgg gcc
240
25 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
65 70 75 80

tcc ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt
288
30 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

	85	90	95
	aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat tac		
	336		
5	Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr		
	100	105	110
	tgc atg caa gct cga caa act cca ttc act ttc ggc cct ggg acc aaa		
	384		
10	Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys		
	115	120	125
	gtg gat atc aga cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg		
	432		
15	Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro		
	130	135	140
	cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg		
	480		
20	Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu		
	145	150	155
			160
	ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat		
	528		
25	Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp		
	165	170	175
	aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac		
	576		
30	Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp		

	180	185	190
agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa			
624			
5 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys			
195	200	205	
gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag			
672			
10 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln			
210	215	220	
ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag			
720			
15 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *			
225	230	235	
20 <210> 2			
<211> 239			
<212> PRT			
<213> Sequência Artificial			
25 <220>			
<223> Cadeia Leve de anticorpo anti-CD40 humano 12.12			
<400> 2			
Met Ala Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser			
30 1	5	10	15

Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Thr
 20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

5 Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Val Leu Ile Ser Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 10 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Met Gln Ala Arg Gln Thr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys
 115 120 125

15 Val Asp Ile Arg Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 20 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

25 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 3
<211> 2016
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

5
<220>
<223> Sequência de Codificação para cadeia pesada de anticorpo
anti-CD40 humano 12.12 (com íntrons)

10 <400> 3
atg gag ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctt gtt gct att tta aga ggt
48
gtc cag tgt cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag
96
15 cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc
144
agt agc tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg
192
gag tgg gtg gca gtt ata tca tat gag gaa agt aat aga tac cat gca
20 240
gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag atc
288
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctc aga act gag gac acg gct gtg
336
25 tat tac tgt gcg aga gat ggg ggt ata gca gca cct ggg cct gac tac
384
tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca gca agt acc aag ggc
432
cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc gct agc aag agc acc tct ggg ggc
30 480

aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg
528
acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc
576
5 ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg
624
acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg
672
aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag aga gtt ggt gag agg
10 720
cca gca cag gga ggg agg gtg tct gct gga agc cag gct cag cgc tcc
768
tgc ctg gac gca tcc cgg cta tgc agt ccc agt cca ggg cag caa ggc
816
15 agg ccc cgt ctg cct ctt cac ccg gag gcc tct gcc cgc ccc act cat
864
gct cag gga gag ggt ctt ctg gct ttt tcc cca ggc tct ggg cag gca
912
cag gct agg tgc ccc taa ccc agg ccc tgc aca caa agg ggc agg tgc
20 960
tgg gct cag acc tgc caa gag cca tat ccg gga gga ccc tgc ccc tga
1008
cct aag ccc acc cca aag gcc aaa ctc tcc act ccc tca gct cgg aca
1056
25 cct tct ctc ctc cca gat tcc agt aac tcc caa tct tct ctc tgc aga
1104
gcc caa atc ttg tga caa aac tca cac atg ccc acc gtg ccc agg taa
1152
gcc agc cca ggc ctc gcc ctc cag ctc aag gcg gga cag gtg ccc tag
30 1200

agt agc ctg cat cca ggg aca ggc ccc agc cggtg ctg aca cgt cca
1248

cct cca tct ctt cct cag cac ctg aac tcc tgg ggg gac cgt cag tct
1296

5 tcc tct tcc ccc caa aac cca agg aca ccc tca tga tct ccc gga ccc
1344

ctg agg tca cat gcg tgg tgg tgg acg tga gcc acg aag acc ctg agg
1392

tca agt tca act ggt acg tgg acg gcg tgg agg tgc ata atg cca aga
10 1440

caa agc cgc ggg agg agc agt aca aca gca cgt acc gtg tgg tca gcg
1488

tcc tca ccg tcc tgc acc agg act ggc tga atg gca agg agt aca agt
1536

15 gca agg tct cca aca aag ccc tcc cag ccc cca tcg aga aaa cca tct
1584

cca aag cca aag gtg gga ccc gtg ggg tgc gag ggc cac atg gac aga
1632

ggc cgg ctc ggc cca ccc tct gcc ctg aga gtg acc gct gta cca acc
20 1680

tct gtc cct aca ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc
1728

cca tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg
1776

25 gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat
1824

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc
1872

gac ggc tcc ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg
30 1920

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg
 1968

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

5

<210> 4

<211> 469

<212> PRT

10 <213> Sequência Artificial

<220>

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

15 <400> 4

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

20 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Glu Glu Ser Asn Arg Tyr His Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Ile
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

30 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Gly Ile Ala Ala Pro Gly Pro Asp Tyr

	115	120	125	
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly			
	130	135	140	
	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly			
5	145	150	155	160
	Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
	165	170	175	
	Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
	180	185	190	
10	Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
	195	200	205	
	Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val			
	210	215	220	
	Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys			
15	225	230	235	240
	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu			
	245	250	255	
	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr			
	260	265	270	
20	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val			
	275	280	285	
	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
	290	295	300	
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser			
25	305	310	315	320
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu			
	325	330	335	
	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala			
	340	345	350	
30	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro			

	355	360	365
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
	370	375	380
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
5	385	390	395
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		400
	405	410	415
	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	420	425	430
10	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	435	440	445
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
	450	455	460
	Leu Ser Pro Gly Lys		
15	465		

	<210> 5			
	<211> 469			
20	<212> PRT			
	<213> Sequência Artificial			
	<220>			
	<223> Cadeia pesada de variante de anticorpo anti-CD40 humano			
25	12.12			
	<400> 5			
	Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Arg Gly			
	1	5	10	15
30	Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln			

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

	260	265	270
	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
	275	280	285
	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
5	290	295	300
	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
	305	310	315
	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
	325	330	335
10	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
	340	345	350
	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
	355	360	365
	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
15	370	375	380
	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
	385	390	395
	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
	405	410	415
20	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
	420	425	430
	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
	435	440	445
	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
25	450	455	460
	Leu Ser Pro Gly Lys		
	465		
30	<210> 6		

<211> 239

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

5 <220>

<223> Cadeia Leve de anticorpo anti-CD40 humano 5.9

<400> 6

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

10 1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

15 Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg

50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Phe Phe Arg Arg Leu

65 70 75 80

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

20 85 90 95

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

100 105 110

Cys Met Gln Val Thr Gln Phe Pro His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg

115 120 125

25 Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

130 135 140

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

145 150 155 160

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

30 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 5 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

10
 <210> 7
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

15
 <220>
 <223> Cadeia pesada de anticorpo anti-CD40 humano 5.9

<400> 7

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

	85	90	95
	Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met		
	100	105	110
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr		
5	115	120	125
	Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
	130	135	140
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ala Ser Lys		
	145	150	155
10	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	165	170	175
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	180	185	190
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
15	195	200	205
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
	210	215	220
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	225	230	235
20	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
	245	250	255
	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
	260	265	270
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
25	275	280	285
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
	290	295	300
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
	305	310	315
30	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		

	325	330	335
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
	340	345	350
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
5	355	360	365
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
	370	375	380
	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	385	390	395
10	395 400		
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	405	410	415
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
	420	425	430
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
15	435	440	445
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	450	455	460
	460 465 470		
20			

<210> 8

<211> 474

<212> PRT

25 <213> Sequência Artificial

<220>

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

5.9

<400> 8

	Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly		
1		5	10
	Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys		
5		20	25
	Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe		
		35	40
	Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu		
		50	55
10	Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser		
		65	70
	Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser		
		85	90
	Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met		
15		100	105
	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Ala Ala Gly Arg Asp Tyr Tyr Tyr		
		115	120
	Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
		130	135
20	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
		145	150
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
		165	170
25	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
		180	185
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
		195	200
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
		210	215
30	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
		220	

	225	230	235	240
	Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys			
	245	250		255
	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro			
5	260	265		270
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys			
	275	280		285
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp			
	290	295		300
10	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu			
	305	310	315	320
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu			
	325	330		335
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn			
15	340	345		350
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly			
	355	360		365
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
	370	375		380
20	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	385	390	395	400
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
	405	410		415
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
25	420	425		430
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
	435	440		445
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
	450	455		460
30	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			

465 470

<210> 9
5 <211> 612
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CDS
<222> (1) ... (612)

<221> característica_misc
<222> (0) ... (0)
15 <223> Sequência de Codificação para isoforma de CD40 humano
curto

<400> 9
atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc
20 48
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1 5 10 15
Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
25 96
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
20 25 30
Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg
30 144

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val			
35	40	45	
agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa			
5 192			
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu			
50	55	60	
agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac			
10 240			
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His			
65	70	75	80
aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cgg gtc cag cag aag ggc acc			
15 288			
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr			
85	90	95	
tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg			
20 336			
Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr			
100	105	110	
agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc			
25 384			
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly			
115	120	125	
ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag			
30 432			

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
 130 135 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa
 5 480

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys
 145 150 155 160

tgt cac cct tgg aca agg tcc cca gga tcg gct gag agc cct ggt ggt
 10 528

Cys His Pro Trp Thr Arg Ser Pro Gly Ser Ala Glu Ser Pro Gly Gly
 165 170 175

gat ccc cat cat ctt cggtt gat cct gtt tgc cat cct ctt ggt gct ggt
 15 576

Asp Pro His His Leu Arg Asp Pro Val Cys His Pro Leu Gly Ala Gly
 180 185 190

ctt tat caa aaa ggt ggc caa gaa gcc aac caa taa
 20 612

Leu Tyr Gln Lys Gly Gly Gln Glu Ala Asn Gln *

195 200

25 <210> 10
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 10

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

<210> 11

30 <211> 834

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

5 <221> CDS

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

<221> característica_misc

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

10 <223> Sequência de Codificação para isoforma de CD40 humano longo

<400> 11

atg gtt cgt ctg cct ctg cag tgc gtc ctc tgg ggc tgc ttg ctg acc

15 48

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

1 5 10 15

gct gtc cat cca gaa cca ccc act gca tgc aga gaa aaa cag tac cta

20 96

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

20 25 30

ata aac agt cag tgc tgt tct ttg tgc cag cca gga cag aaa ctg gtg

25 144

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

35 40 45

agt gac tgc aca gag ttc act gaa acg gaa tgc ctt cct tgc ggt gaa

30 192

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
 50 55 60

agc gaa ttc cta gac acc tgg aac aga gag aca cac tgc cac cag cac
 5 240

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
 65 70 75 80

aaa tac tgc gac ccc aac cta ggg ctt cggtt cgtt cgtt cgtt cgtt cgtt
 10 288

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
 85 90 95

tca gaa aca gac acc atc tgc acc tgt gaa gaa ggc tgg cac tgt acg
 15 336

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr
 100 105 110

agt gag gcc tgt gag agc tgt gtc ctg cac cgc tca tgc tcg ccc ggc
 20 384

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly
 115 120 125

ttt ggg gtc aag cag att gct aca ggg gtt tct gat acc atc tgc gag
 25 432

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu
 130 135 140

ccc tgc cca gtc ggc ttc ttc tcc aat gtg tca tct gct ttc gaa aaa
 30 480

	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys
145																
	tgt	cac	cct	tgg	aca	agc	tgt	gag	acc	aaa	gac	ctg	gtt	gtg	caa	cag
5	528															
	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val	Val	Gln	Gln
	165											170				175
10	576															
	gca	ggc	aca	aac	aag	act	gat	gtt	gtc	tgt	ggt	ccc	cag	gat	cgg	ctg
15	624															
	Ala	Gly	Thr	Asn	Lys	Thr	Asp	Val	Val	Cys	Gly	Pro	Gln	Asp	Arg	Leu
	180											185				190
	aga	gcc	ctg	gtg	gtg	atc	ccc	atc	atc	ttc	ggg	atc	ctg	ttt	gcc	atc
20	672															
	Arg	Ala	Leu	Val	Val	Ile	Pro	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Leu	Phe	Ala	Ile
	195											200				205
	ctc	ttg	gtg	ctg	gtc	ttt	atc	aaa	aag	gtg	gcc	aag	aag	cca	acc	aat
25	720															
	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Lys	Lys	Val	Ala	Lys	Lys	Pro	Thr	Asn
	210											215				220
	aag	gcc	ccc	cac	ccc	aag	cag	gaa	ccc	cag	gag	atc	aat	ttt	ccc	gac
30	768															
	lys	ala	pro	his	pro	lys	gln	glu	pro	gln	glu	ile	asn	phe	pro	asp
	225											230				240
	gat	ctt	cct	ggc	tcc	aac	act	gct	gct	cca	gtg	cag	gag	act	tta	cat

	Asp Leu Pro Gly Ser Asn Thr Ala Ala Pro Val Gln Glu Thr Leu His			
	245	250	255	
	gga tgc caa ccg gtc acc cag gag gat ggc aaa gag agt cgc atc tca			
5	816			
	Gly Cys Gln Pro Val Thr Gln Glu Asp Gly Lys Glu Ser Arg Ile Ser			
	260	265	270	
	gtg cag gag aga cag tga			
10	834			
	Val Gln Glu Arg Gln *			
	275			
15	<210> 12			
	<211> 277			
	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
20	<400> 12			
	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr			
	1	5	10	15
	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu			
	20	25	30	
25	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val			
	35	40	45	
	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu			
	50	55	60	
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His			
30	65	70	75	80

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



PI0710826-5

1/18

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica líquida estável
caracterizada pelo fato de compreender:

a) um anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista como
5 um componente ativo terapeuticamente ou profláticamente,
onde o referido anticorpo monoclonal é capaz de ligar-se
especificamente a um antígeno CD40 humano sendo livre de
atividade agonista significante quando ligado ao antígeno
CD40 expressado na superfície da referida célula B;

10 b) uma quantidade de arginina na sua forma ácida
(arginina-HCl) suficiente para tornar a referida composição
quase isotônica; e

c) uma agente de tamponamento para manter o pH da
referida composição dentro de uma faixa de pH de cerca de
15 5,0 a cerca de 7,0, onde o referido agente de tamponamento
é um tampão citrato/ácido cítrico.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que a referida composição possui
uma osmolalidade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360
20 mmol/kg.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que o agente de tamponamento é
de cerca de 5 mM a cerca de 100 mM.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 3,
25 caracterizada pelo fato de que o agente de tamponamento é
de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 4,
caracterizada pelo fato de que o agente de tamponamento é
de cerca de 10 mM.

30 6. Composição, de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1, 2, 3, 4 ou 5, caracterizada pelo fato de que o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 6,
5 caracterizada pelo fato de que a referida composição possui um ph de cerca de 5,5.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende arginina-HCl a uma concentração de cerca de 50
10 mM a cerca de 200 mM.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 8,
caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende arginina-HCl a uma concentração de cerca de 100 mM a cerca de 175 mM.

15 10. Composição, de acordo com a reivindicação 9,
caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende arginina-HCl a uma concentração de cerca de 150 mM.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 8,
20 caracterizada pelo fato de que a concentração do agente de tamponamento é de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 11,
25 caracterizado pelo fato de que o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico, e onde a concentração do referido agente de tamponamento é de cerca de 10 mM, e a referida composição possui um pH de cerca de 5,5.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 12,
30 caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende arginina-HCl a uma concentração de cerca de 150

mM.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por também compreender um tensoativo.

5 15. Composição, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o referido tensoativo é polissorbato 20.

10 16. Composição, de acordo com a reivindicação 15, caracterizada pelo fato de que o referido tensoativo é polisorbato 20 a uma concentração de cerca de 0,001% a cerca de 1,0% (w/v).

15 17. Composição, de acordo com a reivindicação 16, caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende polisorbato 20 a uma concentração de cerca de 0,025% a cerca de 0,1% (w/v).

20 18. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 14, caracterizada pelo fato de também compreender metionina em uma quantidade suficiente para inibir oxidação de pelo menos um resíduo de aminoácido oxidável no referido anticorpo monoclonal anti-CD40 durante a armazenagem da referida composição.

19. Composição, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende metionina a uma concentração de cerca de 0,5 mM a cerca de 20,0 mM.

25 20. Composição, de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende metionina a uma concentração de cerca de 1,0 mM a cerca de 20,0 mM.

30 21. Composição, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a referida composição

compreende metionina a uma concentração de cerca de 5,0 mM.

22. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21, caracterizada pelo fato 5 de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista é selecionado a partir do grupo consistindo de:

a) anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12;

b) anticorpo monoclonal produzido pela linha de célula de hibridoma 5.9 ou 12.12;

10 c) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°:6, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:7, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:8, ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:6 e 15 Id. de Seq. n°:7, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:6 e Id. de Seq. n°:8;

d) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°:2, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:4, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:5, ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:2 e 20 Id. de Seq. n°:4, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:2 e Id. de Seq. n°:5;

e) um anticorpo monoclonal possuindo uma seqüência de 25 aminoácido codificada por uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°: 1, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:3, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°: 1 e Id. de 30 Seq. N°:3;

- f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha de célula de hibridoma 5.9 ou 12.12;
- g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo 5 compreendendo os resíduos 82 a 87 da seqüência CD40 humana exposta em Id. de Seq. n°: 10 ou Id. de Seq. N°:12;
- h) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo compreendendo os resíduos 82 a 87 da seqüência CD40 humana exposta em Id. de Seq. n°: 10 ou Id. de Seq. N°:12;
- i) um anticorpo monoclonal que compete com o anticorpo 10 monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 em um ensaio de ligação competitivo;
- j) o anticorpo monoclonal do item precedente a) ou um 15 anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens precedentes c)-i) onde o referido anticorpo é recombinantemente produzido; e
- k) um anticorpo monoclonal que é um fragmento que se 20 liga a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer uma dos itens precedentes a)-j), onde o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.
23. Composição, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o referido fragmento é selecionado a partir do grupo consistindo de um fragmento 25 Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fv e um fragmento Fv de cadeia única.
24. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ou 23, caracterizada 30 pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40

antagonista está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50 mg/mL.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 1,0 mg/mL a cerca de 35 mg/mL.

10 26. Composição, de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35 mg/mL.

15 27. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida composição é estável a uma temperatura de cerca de 2°C a cerca de 8°C por um período de pelo menos 18 meses.

20 28. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a referida composição é estável a uma temperatura de cerca de 25°C por um período de pelo menos 3 meses.

25 29. Composição farmacêutica líquida estável caracterizada pelo fato de compreender um anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista como um componente ativo terapeuticamente ou proflaticamente, arginina em sua forma ácida (arginina-HCl) a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, e um agente de tamponamento para manter o pH da referida composição dentro de uma faixa de cerca de 5 a cerca de 7, onde o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de 30 cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, onde o referido anticorpo

monoclonal anti-CD40 antagonista é selecionado a partir do grupo consistindo de:

- a) anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12;
- b) anticorpo monoclonal produzido pela linha de célula de hibridoma 5.9 ou 12.12;
- 5 c) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°:6, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:7, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:8, ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:6 e Id. de Seq. n°:7, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:6 e Id. de Seq. n°:8;
- 10 d) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°:2, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:4, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:5, ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:2 e Id. de Seq. n°:4, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:2 e Id. de Seq. n°:5;
- 15 e) um anticorpo monoclonal possuindo uma seqüência de aminoácido codificada por uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°: 1, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:3, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°: 1 e Id. de Seq. N°:3;
- 20 f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha de célula de hibridoma 5.9 ou 12.12;
- 25 g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo

compreendendo os resíduos 82 a 87 da seqüência CD40 humana exposta em Id. de Seq. n°: 10 ou Id. de Seq. N°:12;

h) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo compreendendo os resíduos 82 a 89 da seqüência CD40 humana exposta em Id. de Seq. n°: 10 ou Id. de Seq. N°:12;

i) anticorpo monoclonal que concorre com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 em um ensaio de ligação competitivo;

j) anticorpo monoclonal do item precedente a) ou um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer um dos itens precedentes c)-i), onde o referido anticorpo é recombinantemente produzido; e

k) um anticorpo monoclonal que é um fragmento que se liga a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens precedentes a)-j), onde o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

30. Composição, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que o referido fragmento é selecionado a partir do grupo consistindo de um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fv e um fragmento Fv de cadeia única.

31. Composição, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a referida composição compreende arginina-HCl a uma concentração de cerca de 150 mM e o agente de tamponamento é citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, onde a referida composição possui um pH de cerca de 5,0 a cerca de 6,0 e uma osmolalidade de cerca de 250 mmol/kg a cerca de 330 mmol/kg.

32. Composição, de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a referida composição também compreende metionina, polissorbato 20 ou ambos, metionina e polissorbato 20, onde a referida metionina quando presente 5 está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 0,5 mM a cerca de 20,0 mM, e onde o referido polissorbato 20 quando presente está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 0,025% a cerca de 0,1% (p/v).

10 33. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 29, 30, 31 ou 32, caracterizada pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35 mg/mL.

15 34. Composição, de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista é o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12.

35. Método para tratar um indivíduo possuindo câncer 20 ou condição pré-maligna que está associada com células que expressam CD40, o referido método caracterizado por compreender administrar uma quantidade farmaceuticamente efetiva da composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 25 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que referido câncer é caracterizado pelo desenvolvimento de célula B neoplástica.

30 37. Método, de acordo com a reivindicação 36,

caracterizado pelo fato de que o referido câncer é selecionado a partir do grupo consistindo de linfoma não Hodgkin, leucemia linfocítica crônica, mieloma múltiplo, linfoma de célula B, linfoma de célula B de alto grau, 5 linfoma de célula B de grau intermediário, linfoma de célula B de grau baixo, leucemia linfoblástica aguda de célula B, doença de Hodgkin, plasmacitoma, linfoma folicular, linfoma clivado pequeno folicular, linfoma de célula grande folicular, linfoma clivado pequeno misturado 10 folicular, linfoma difuso de célula clivada pequena, leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmacítico, linfoma de zona marginal, linfoma de tecido linfóide associado à mucosa, linfoma de célula B monocitóide, linfoma esplênico, leucemia de células pilosas, linfoma de célula grande 15 difuso, linfoma de grande célula B mediastínico, granulomatose linfomatóide, linfomatose intravascular, linfoma de células misturadas, linfoma difuso de grandes células, linfoma imunoblástico, linfoma de Burkitt, linfoma relacionado a AIDS, Macroglobulinemia de Waldenstrom, 20 linfoma de células do manto, e doença de corrente pesada.

38. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que referido câncer é uma malignidade hematológica de células não B.

39. Método, de acordo com a reivindicação 38, 25 caracterizado pelo fato de que a referida malignidade é selecionada a partir de um grupo consistindo de leucemias agudas, leucemias mieloblasticas, leucemias mielocíticas agudas, leucemia promielocítica, leucemia mielomonocítica, leucemia monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica 30 crônica e policitemia vera.

40. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do referido câncer ser um tumor sólido compreendendo células neoplásicas expressando o antígeno CD40.

5 41. Método, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato do referido tumor sólido ser selecionado a partir de um grupo consistindo de carcinoma pulmonar, carcinoma mamário, carcinoma ovariano, carcinoma de pele, carcinoma de cólon, carcinoma de bexiga urinária, 10 carcinoma hepático, carcinoma gástrico, câncer de próstata, carcinoma de célula renal, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas, carcinoma papilar da tireóide, carcinoma cervical e sarcomas.

15 42. Método, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato da condição pré-malígnia ser gamopatia monoclonal de significância indeterminada (MGUS).

20 43. Método para tratar um indivíduo possuindo uma doença inflamatória ou doença auto-imune que está associada com células que expressam CD40, o referido método caracterizado por compreender administrar uma quantidade terapeuticamente efetiva da composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 ou 34.

25 44. Método, de acordo com a reivindicação 43, caracterizado pelo fato de que a referida doença inflamatória ou doença auto-imune é selecionada a partir do grupo consistindo de lúpus sistêmico eritematoso (SLE), lúpus discóide, nefrite por lúpus, sarcoidose, artrite 30 juvenil, artrite reumatóide, artrite psoriática, síndrome

de Reiter, espondilite anquilosante, gota artrite, rejeição de transplante de órgão ou tecido, doença de hospedeiro versus enxerto, esclerose múltipla, síndrome hiper IgE, poliarterite nodosa, cirrose biliar primária, doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, doença celiaca (enteropatia sensível a glúten), hepatite autoimune, anemia perniciosa, anemia hemolítica autoimune, psoríase, escleroderma, miastenia grave, púrpura trombocitopênica autoimune, tiroidite autoimune, doença de Graves, tiroidite de Hashimoto, doença do complexo imune, síndrome de disfunção imune de fadiga crônica (CFIDS), polimiosite e dermatomiosite, crioglobulinemia, thrombólise, cardiomiopatia, pênfigo vulgar, fibrose intersticial pulmonar, sarcoidose, diabetes melitos Tipo I e Tipo II, hipersensibilidade do tipo retardado tipos 1, 2, 3 e 4, alergia ou doenças alérgicas, asma, síndrome de Churg-Strausswsq (granulomatose alérgica), dermatite atópica, dermatite de contato alérgica e irritante, urticária, alergia mediada por IgE, aterosclerose, vasculite, miopatias inflamatórias idiopáticas, doença hemolítica, doença de Alzheimer e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica.

45. Método para aumentar a estabilidade de um anticorpo monoclonal anti-CD40 em uma composição farmacêutica líquida, o referido método caracterizado por compreender formular a referida composição combinando-se o referido anticorpo monoclonal anti-CD40, uma quantidade de arginina-HCl suficiente para tornar a referida composição quase isotônica, e um agente de tamponamento para manter o pH da referida composição entre cerca de 5 e cerca de 7,

onde o referido agente de tamponamento é um tampão citrato/ácido cítrico.

46. Método para preparar uma composição farmacêutica líquida compreendendo um anticorpo monoclonal anti-CD40, o referido método caracterizado por compreender formular a referida composição combinando-se o referido anticorpo monoclonal anti-CD40, uma quantidade de arginina em sua forma ácida (arginina-HCl) suficiente para tornar a referida composição quase isotônica, e um agente de tamponamento para manter o pH da referida composição entre cerca de 5 e cerca de 7, onde o referido agente de tamponamento é um tampão citrato/ácido cítrico.

47. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que a referida composição possui uma osmolalidade de cerca de 240 mmol/kg a cerca de 360 mmol/kg.

48. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que a referida concentração do referido agente de tamponamento é de cerca de 5 mM a cerca de 100 mM, e cerca de 50 mM a cerca de 200 mM de arginina-HCl é combinada com o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 e o referido agente de tamponamento.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, 25 caracterizado pelo fato de que a referida concentração do referido agente de tamponamento é de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM, e cerca de 100 mM a cerca de 175 mM de arginina-HCl é combinada com o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 e o referido agente de tamponamento.

30 50. Método, de acordo com a reivindicação 49,

5 caracterizado pelo fato de que a referida concentração do referido agente de tamponamento é de cerca de 10 mM, e cerca de 150 mM de arginina-HCl é combinada com o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 e o referido agente de tamponamento.

51. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45, 46, 47, 48, 49 ou 50, caracterizado pelo fato de que o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico.

10 52. Método, de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que a referida composição possui um ph de cerca de 5,5.

15 53. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 ou 46, caracterizado pelo fato de que a referida composição é formulada para também compreender metionina, polissorbato 20 ou ambos, metionina e polisorbato 20, onde a referida metionina quando presente está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 0,5 mM a cerca de 20,0 mM, e onde o referido polisorbato 20 quando presente está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 0,025% a cerca de 0,1% (p/v).

20 54. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 ou 53, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista é selecionado a partir do grupo consistindo de:

- 25 a) anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12;
30 b) anticorpo monoclonal produzido pela linha de célula de hibridoma 5.9 ou 12.12;

- c) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°:6, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:7, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:8, ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:6 e Id. de Seq. n°:7, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:6 e Id. de Seq. n°:8;
- 5
- d) um anticorpo monoclonal compreendendo uma seqüência de aminoácido selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°:2, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:4, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:5, ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:2 e Id. de Seq. n°:4, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°:2 e Id. de Seq. n°:5;
- 10
- e) um anticorpo monoclonal possuindo uma seqüência de aminoácido codificada por uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de nucleotídeo selecionada a partir do grupo consistindo da seqüência exposta em Id. de Seq. n°: 1, a seqüência exposta em Id. de Seq. n°:3, e ambas as seqüências expostas em Id. de Seq. n°: 1 e Id. de Seq. N°:3;
- 15
- f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal produzido pela linha de célula de hibridoma 5.9 ou 12.12;
- 20
- g) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo compreendendo os resíduos 82 a 87 da seqüência CD40 humana exposta em Id. de Seq. n°: 10 ou Id. de Seq. N°:12;
- 25
- h) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo compreendendo os resíduos 82 a 89 da seqüência CD40 humana exposta em Id. de Seq. n°: 10 ou Id. de Seq. N°:12;
- 30

i) anticorpo monoclonal que concorre com o anticorpo monoclonal CHIR-5.9 ou CHIR-12.12 em um ensaio de ligação competitivo;

5 j) anticorpo monoclonal do item precedente a) ou um anticorpo monoclonal de acordo com qualquer um dos itens precedentes c)-i), onde o referido anticorpo é recombinantemente produzido; e

10 k) um anticorpo monoclonal que é um fragmento que se liga a antígeno de um anticorpo monoclonal de qualquer um dos itens precedentes a)-j), onde o referido fragmento retém a capacidade de se ligar especificamente ao referido antígeno CD40 humano.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o referido fragmento é selecionado a partir do grupo consistindo de um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento Fv e um fragmento Fv de cadeia única.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 ou 20 55, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50 mg/mL.

57. Método, de acordo com a reivindicação 56, 25 caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo monoclonal anti-CD40 antagonista está presente na referida composição a uma concentração de cerca de 10,0 mg/mL a cerca de 35 mg/mL.

58. Composição farmacêutica líquida estável 30 caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo

monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9, ou fragmento de ligação a antígeno deste, como um componente ativo terapeuticamente ou proflaticamente, arginina em sua forma ácida (arginina-HCl) a uma concentração de cerca de 50 mM a cerca de 200 mM, e um agente de tamponamento para manter o pH da referida composição dentro de uma faixa de cerca de 5 a cerca de 7, onde o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM.

10 59. Método para tratar um indivíduo possuindo câncer ou condição pré-maligna que está associada com células que expressam CD40, o referido método caracterizado por compreender administrar uma quantidade farmaceuticamente efetiva da composição farmacêutica de acordo com a
15 reivindicação 58.

60. Método para tratar um indivíduo possuindo uma doença inflamatória ou autoimune que está associada com células que expressam CD40, o referido método caracterizado por compreender administrar uma quantidade farmaceuticamente efetiva da composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 58.

61. Método para aumentar a estabilidade do anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação a antígeno deste, em uma composição farmacêutica líquida, o
25 referido método caracterizado por compreender formular a referida composição através da combinação do referido anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação a antígeno deste com cerca de 50 mM a cerca de 200 mM de arginina em sua forma ácida (arginina-HCl) e um agente de tamponamento
30 para manter o pH da referida composição entre cerca de 5 a

cerca de 7, onde o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM.

62. Método para preparar uma composição farmacêutica líquida caracterizado por compreender o anticorpo monoclonal CHIR-12.12 ou CHIR-5.9 ou fragmento de ligação a antígeno deste, o referido método compreendendo formular a referida composição através da combinação do referido anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação a antígeno deste com cerca de 50 mM a cerca de 200 mM de arginina em sua forma ácida (arginina-HCl) e um agente de tamponamento para manter o pH da referida composição entre cerca de 5 a cerca de 7, onde o referido agente de tamponamento é um tampão citrato de sódio/ácido cítrico a uma concentração de cerca de 5 mM a cerca de 20 mM.

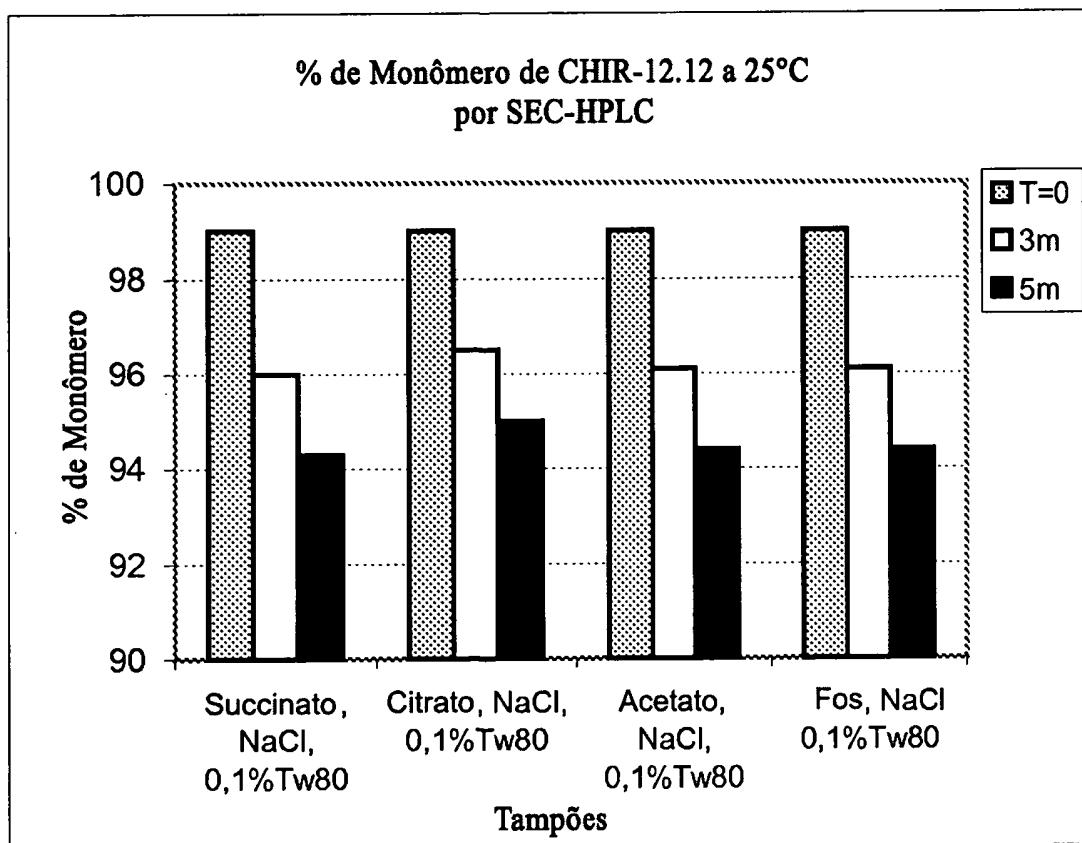
FIGURA 1

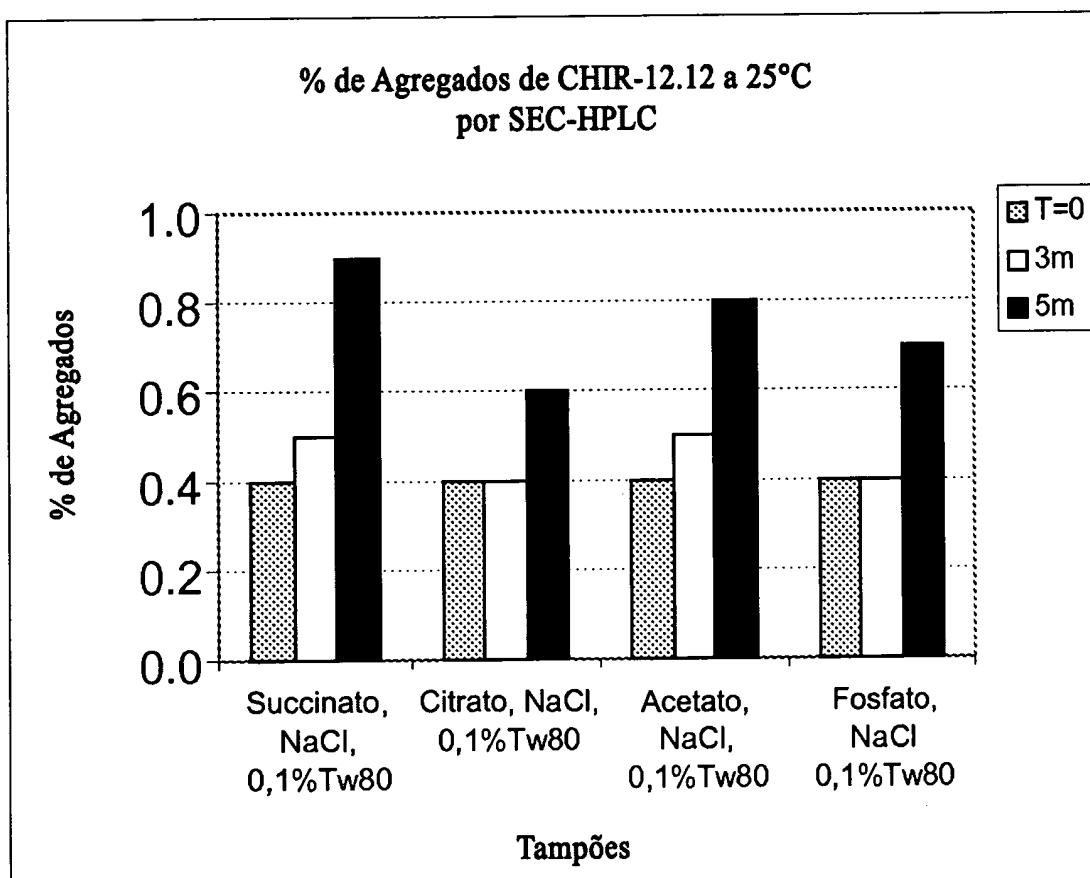
FIGURA 2

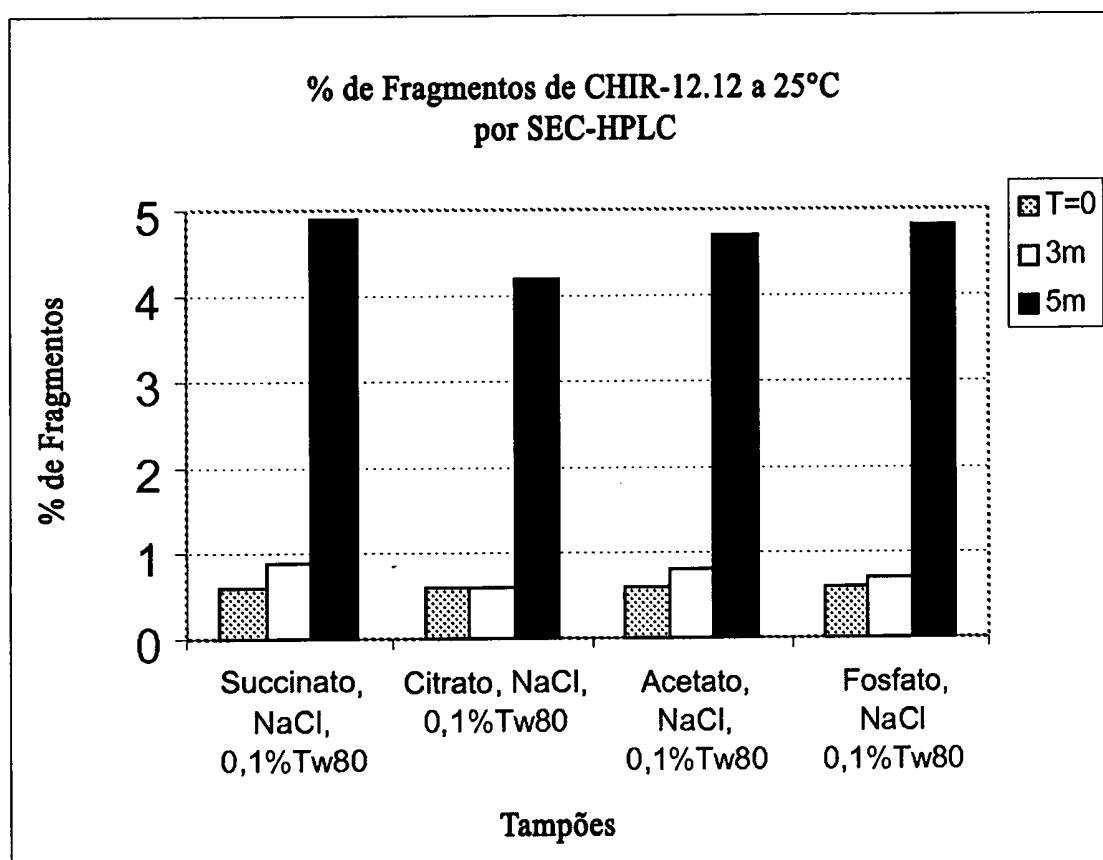
FIGURA 3

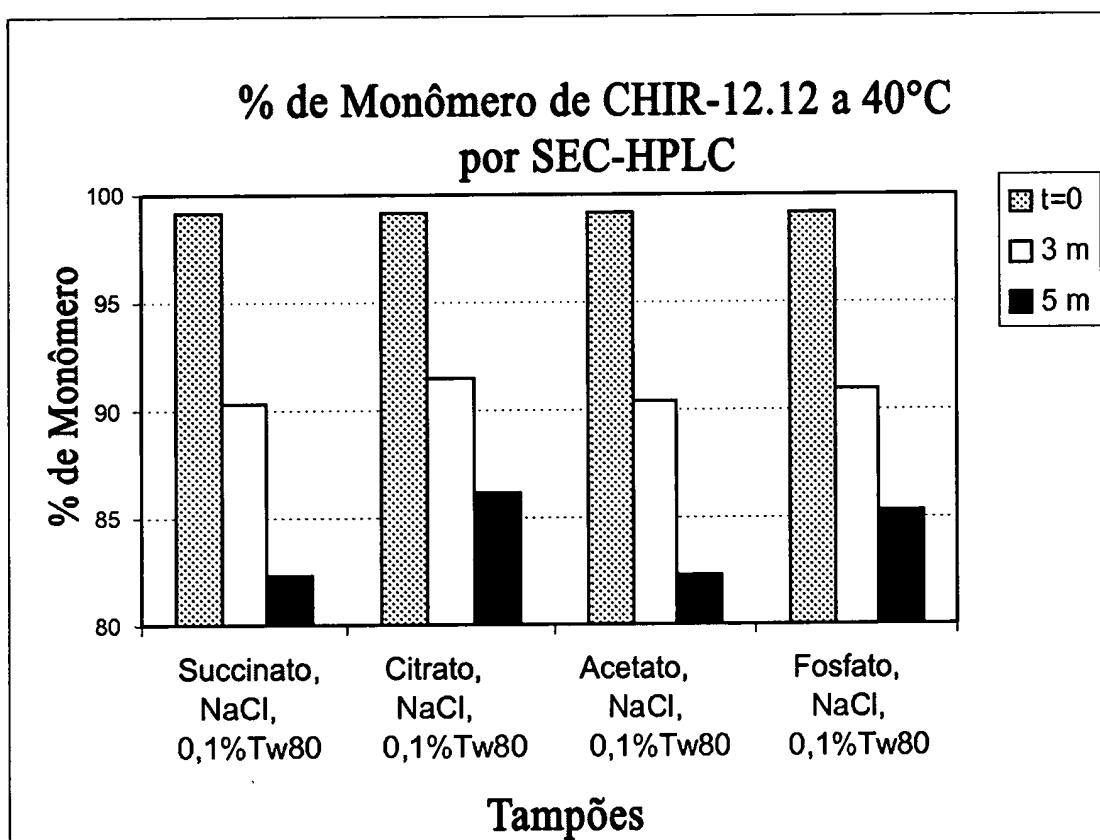
FIGURA 4

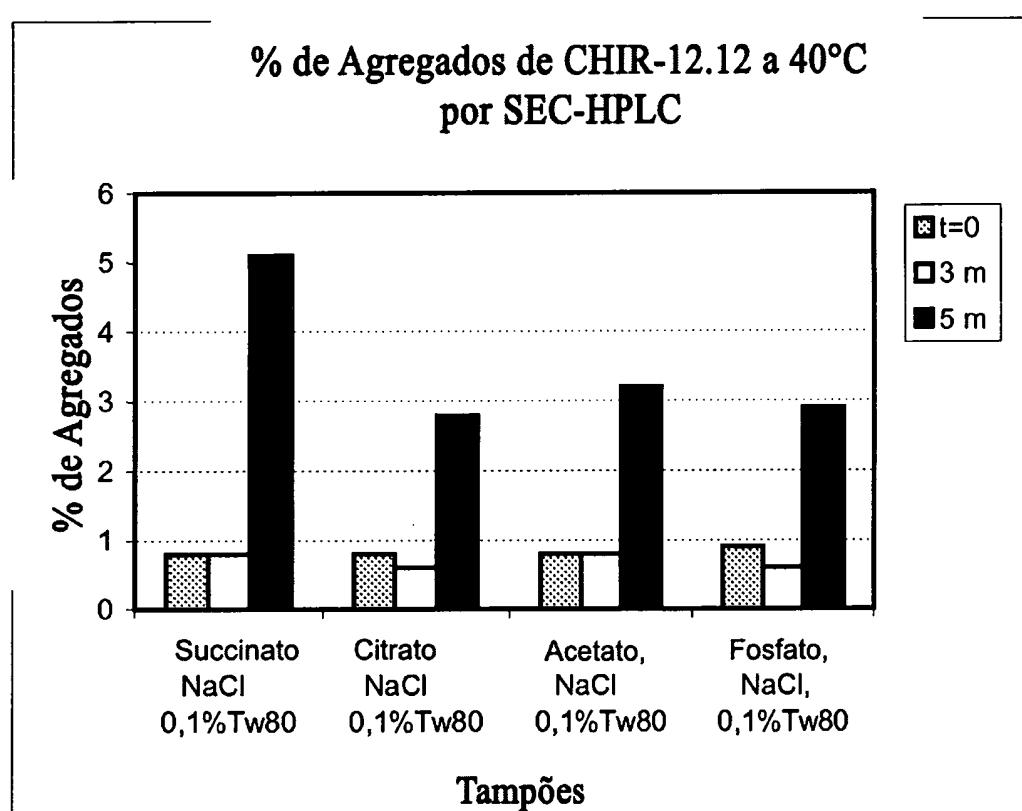
FIGURA 5

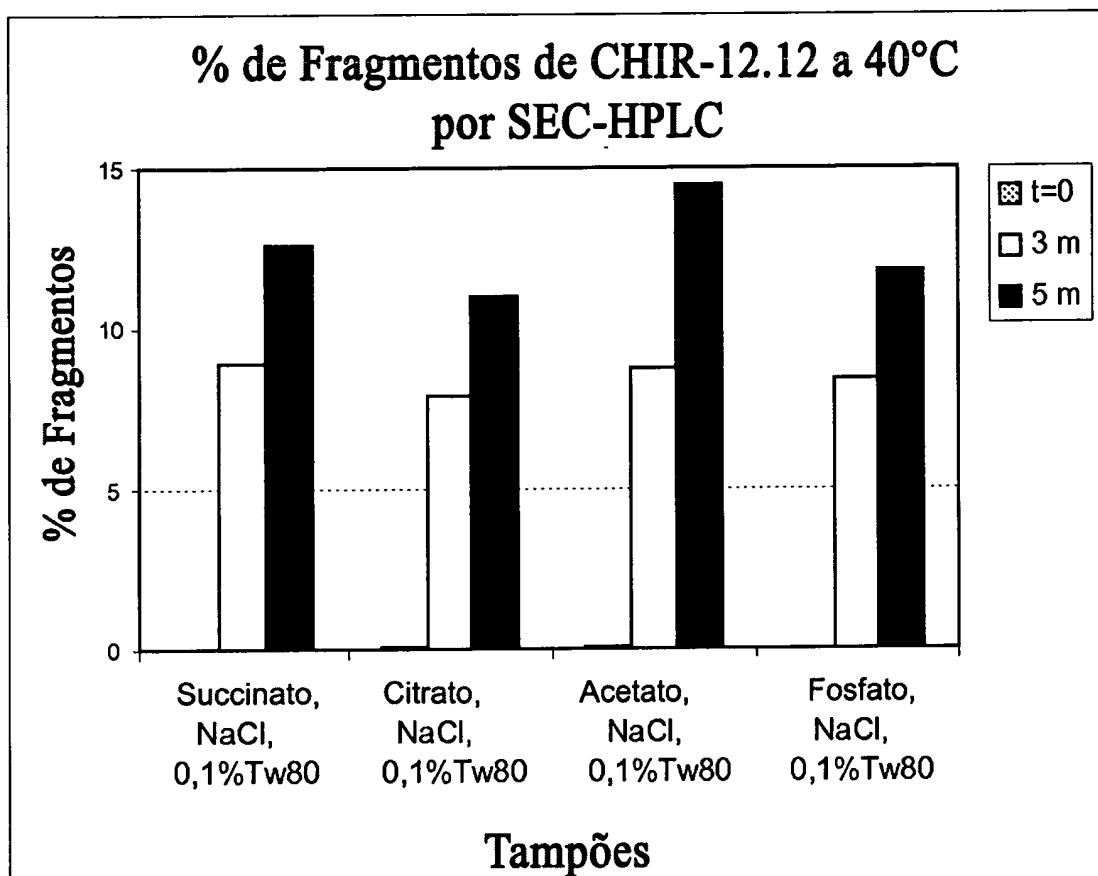
FIGURA 6

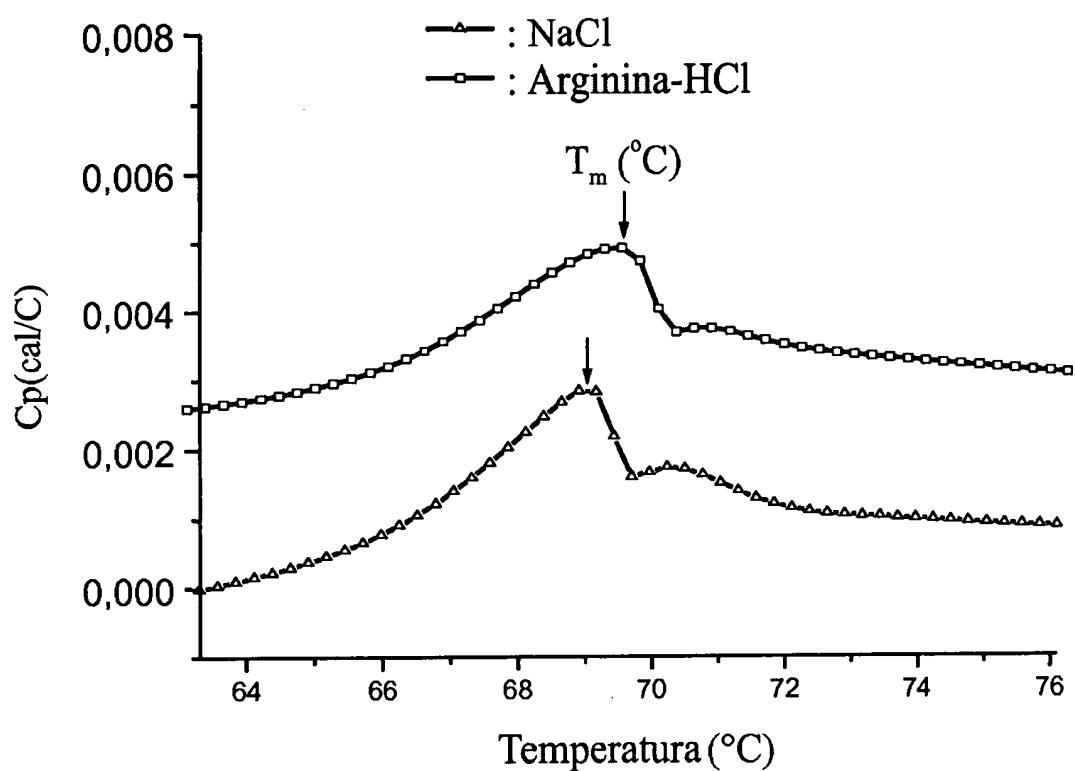
FIGURA 7

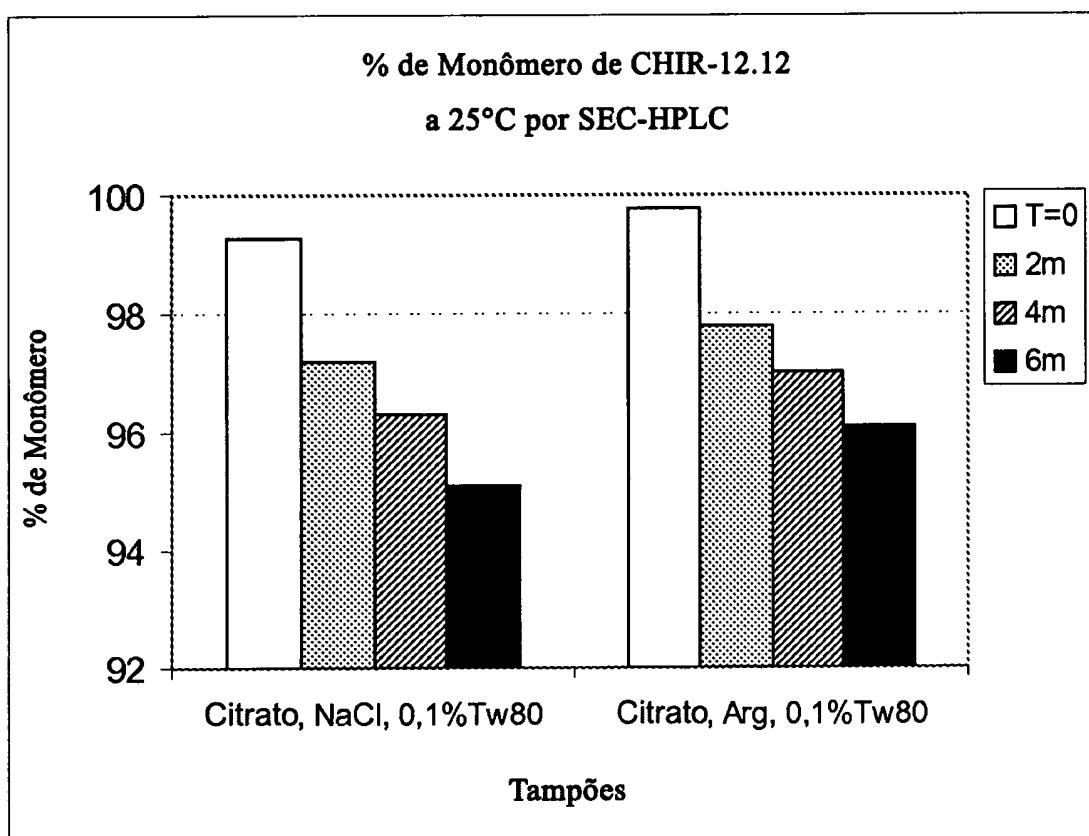
FIGURA 8

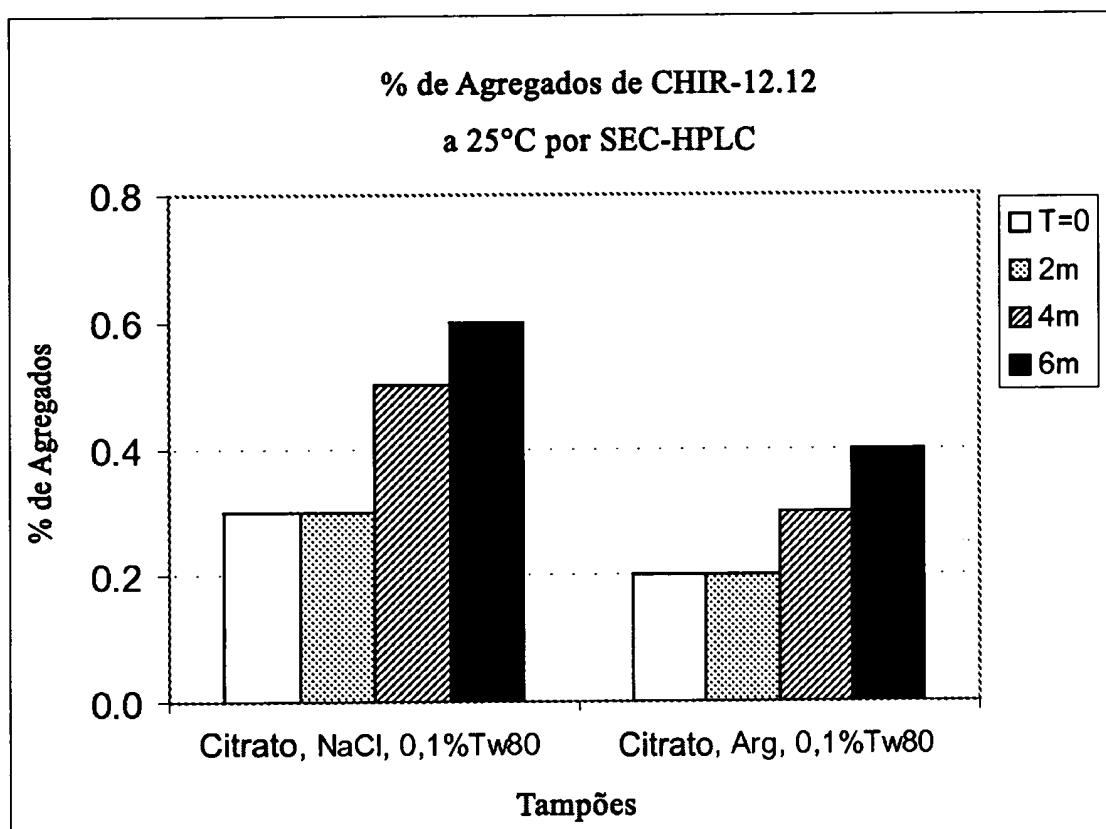
FIGURA 9

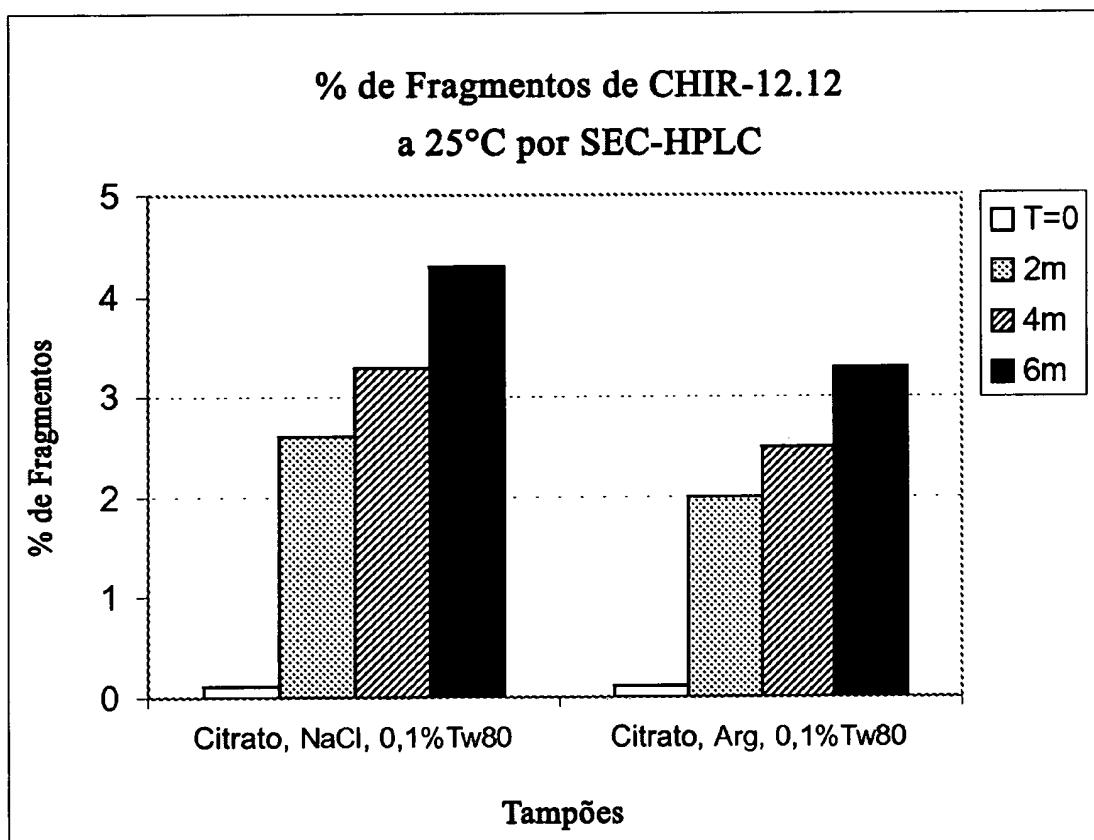
FIGURA 10

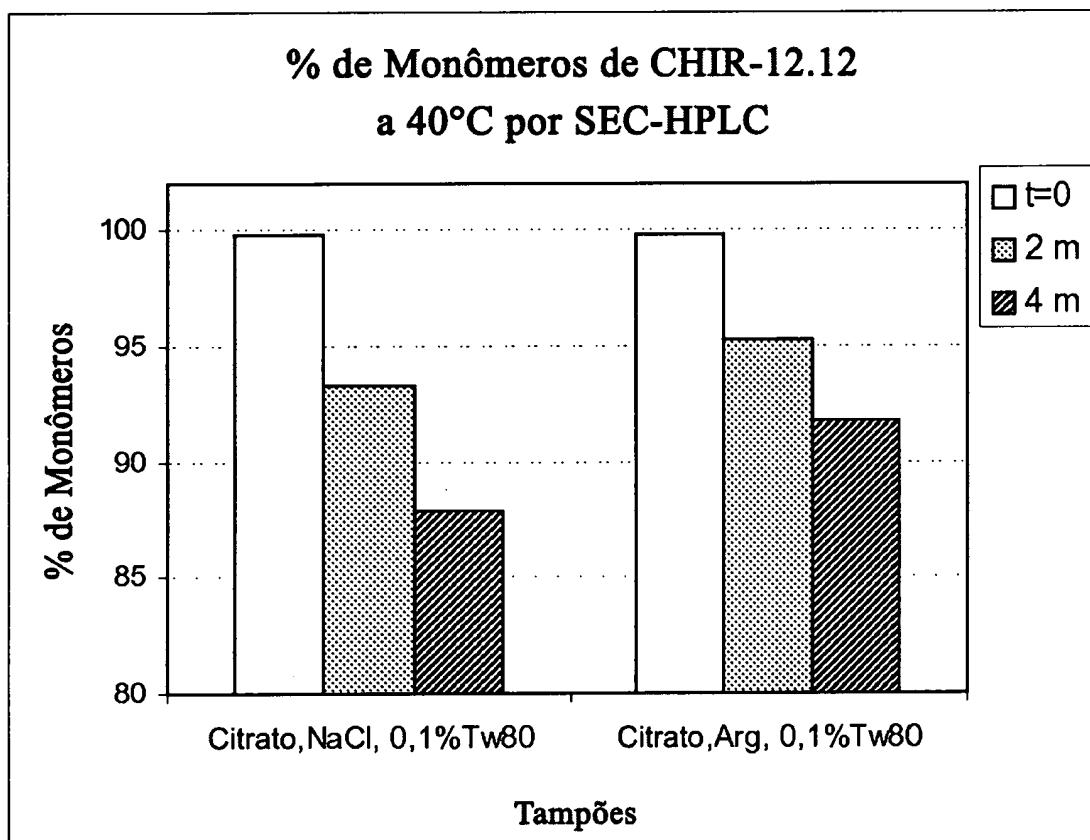
FIGURA 11

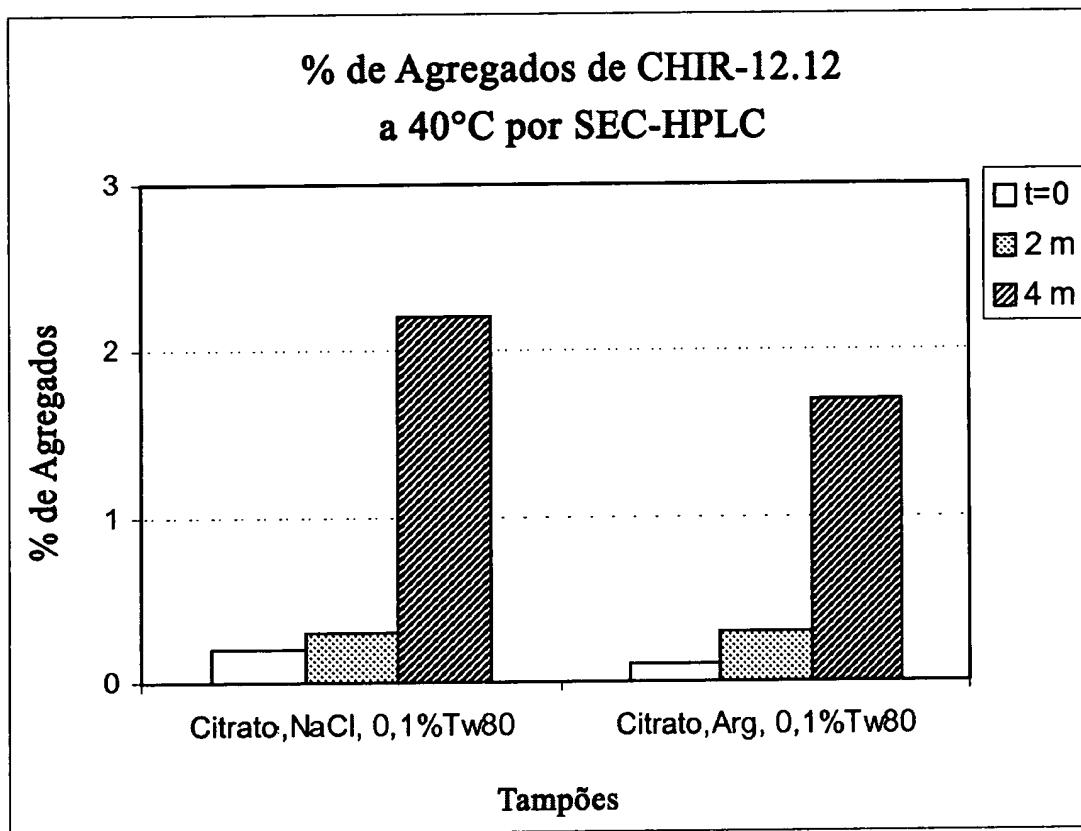
FIGURA 12

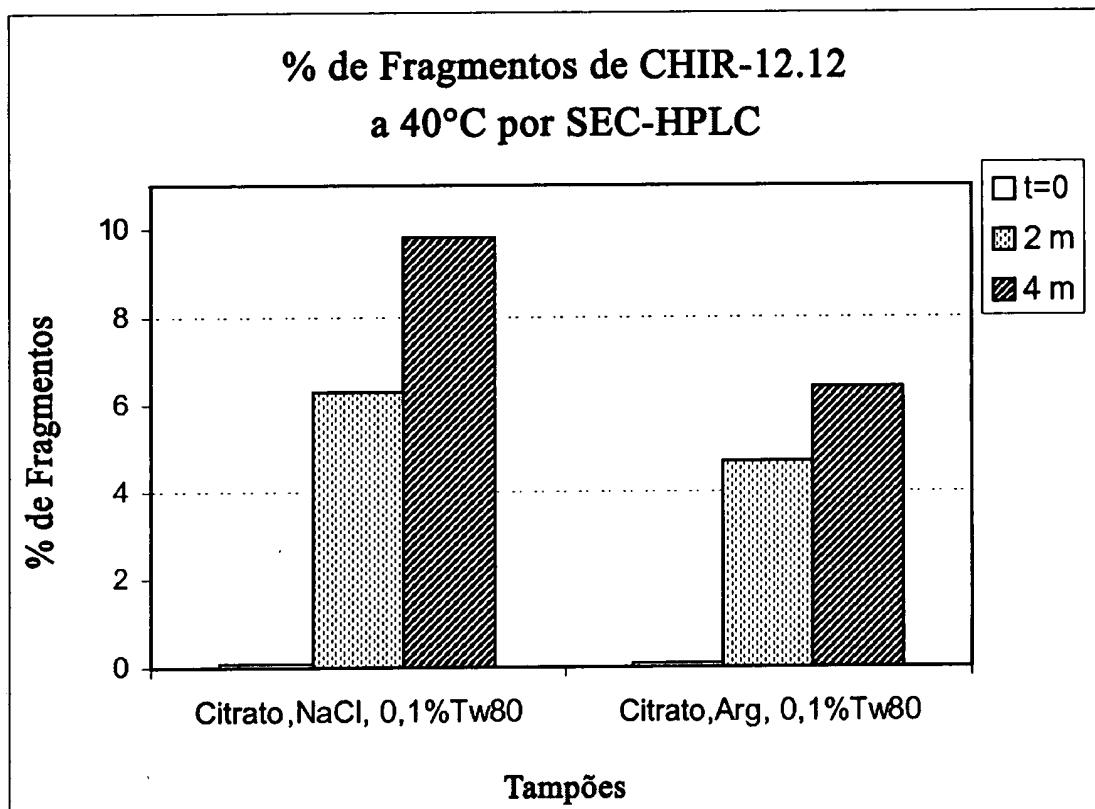
FIGURA 13

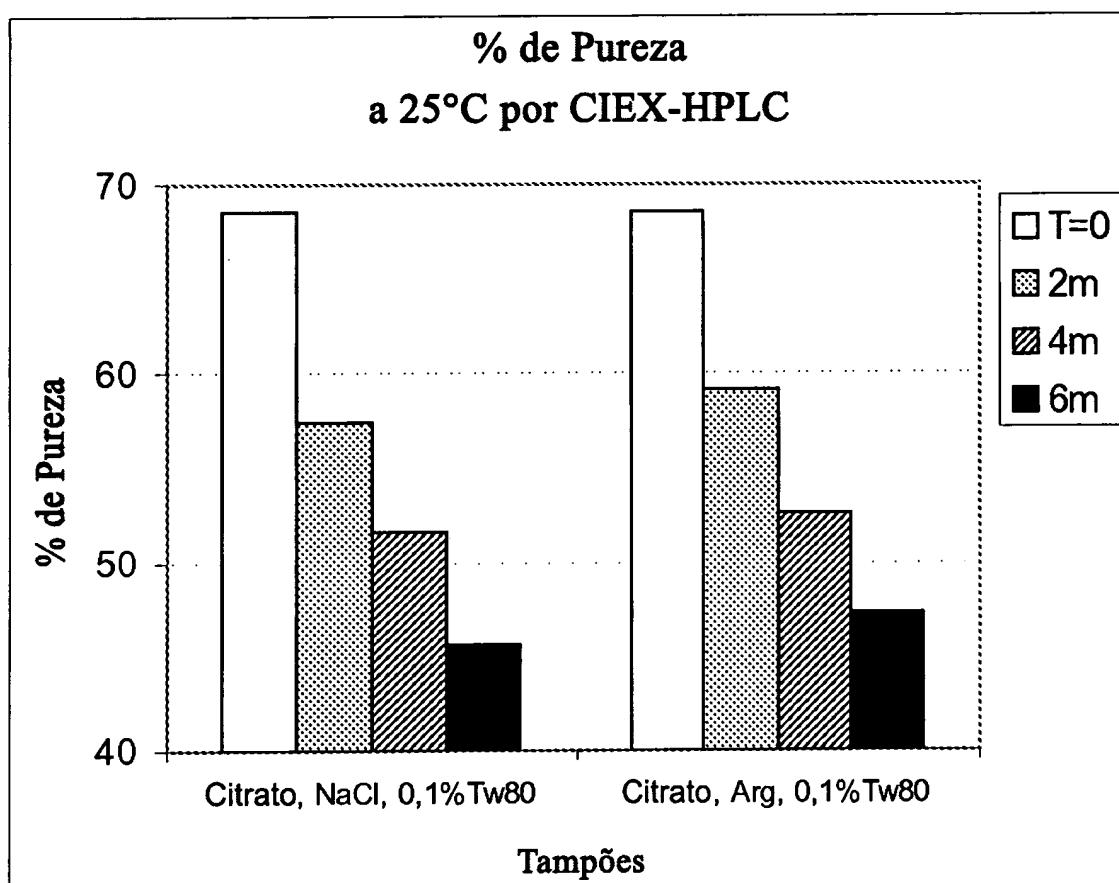
FIGURA 14

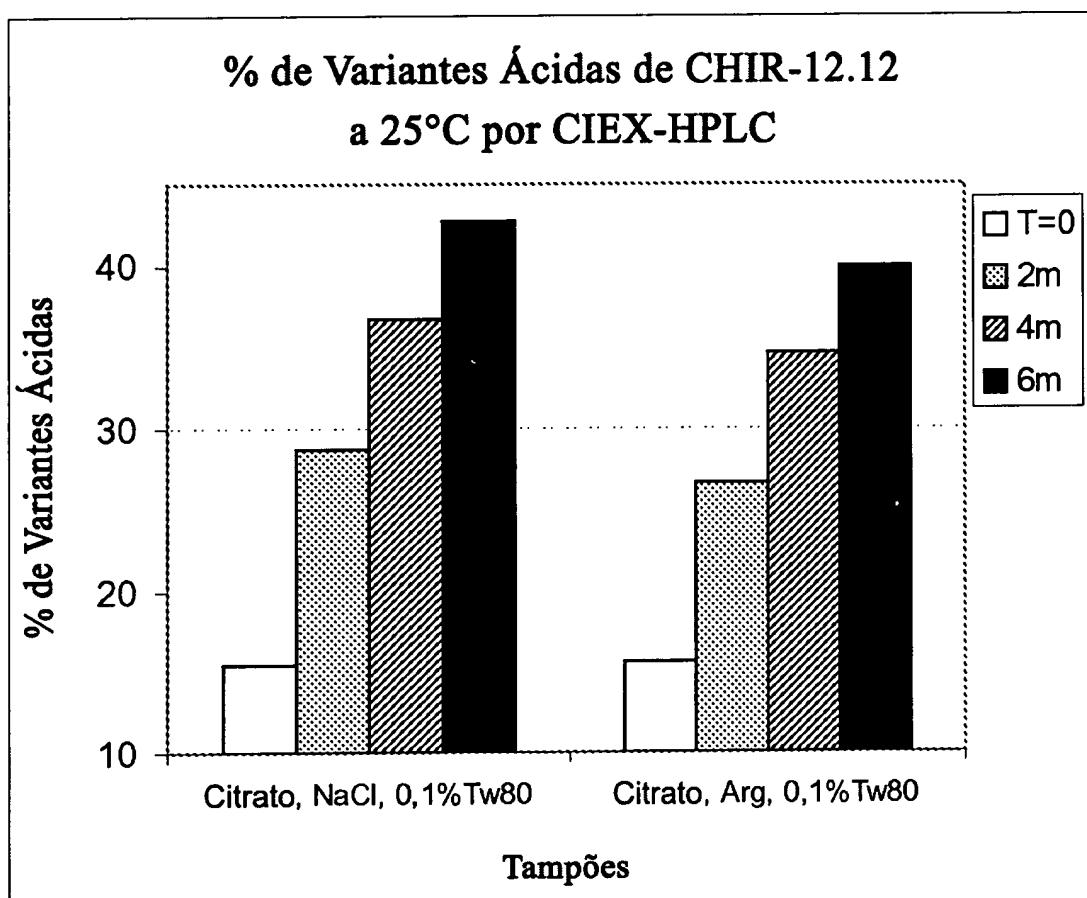
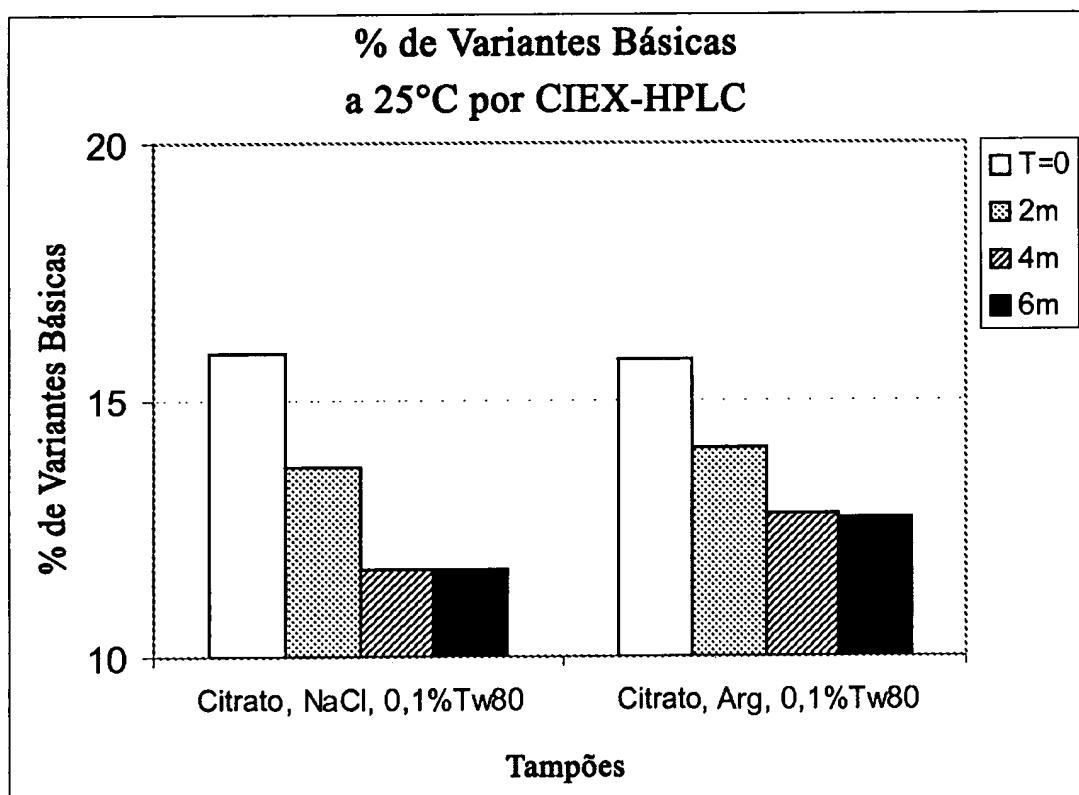
FIGURA 15

FIGURA 16

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS DE ANTICORPO ANTI-CD40**ANTAGONISTA**

Composições farmacêuticas líquidas estáveis compreendendo um anticorpo anti-CD40 antagonista como um componente terapeuticamente ou farmaceuticamente ativo e métodos úteis na sua preparação são fornecidos. Estas composições compreendem o antagonista anti-CD40, um agente de tamponamento para manter o pH da composição entre cerca de 5,0 e cerca de 7,0, e uma quantidade de arginina-HCl suficiente para tornar a composição líquida quase isotônica. As composições farmacêuticas contendo anticorpo anti-CD40 antagonista líquido estável da invenção encontram uso em métodos para tratar doenças proliferativas e doenças possuindo um componente autoimune e/ou inflamatório.