



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

(21) **PI0711355-2 A2**

(22) Data de Depósito: 09/05/2007
(43) Data da Publicação: 27/09/2011
(RPI 2125)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 16/28

(54) Título: POLIPEPTÍDEO, CORPO DE LIGAÇÃO, ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA, CULTURA DE CÉLULA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM POLIPEPTÍDEO, UM CORPO DE LIGAÇÃO, UM ANTICORPO, UM ÁCIDO NUCLEICO E/OU UMA CÉLULA, E, MÉTODOS PARA MUNIR UM INDIVÍDUO COM ANTICORPO E PARA SELECIONAR UM ANTICORPO ANTAGONISTA DE CD40 ANTI-HUMANO

(57) Resumo: POLIPEPTÍDEO, CORPO DE LIGAÇÃO, ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA, CULTURA DE CÉLULA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM POLIPEPTÍDEO, UM CORPO DE LIGAÇÃO, UM ANTICORPO, UM ÁCIDO NUCLEICO E/OU UMA CÉLULA, E, MÉTODOS PARA MUNIR UM INDIVÍDUO COM UM ANTICORPO E PARA SELECIONAR UM ANTICORPO ANTAGONISTA DE CD40 ANTI-HUMANO. A presente invenção fornece novos anticorpos monoclonais CD40 anti-humano antagonísticos, métodos para gerá-los e seus usos.

(30) Prioridade Unionista: 09/05/2006 EP 06076028.7,
09/05/2006 US 60/798819

(73) Titular(es): Pangenetics B.V.

(72) Inventor(es): Kevin Stuart Johnson, Marcel Theodorus Den Hartog, Robert Duncan Casson, Ruprecht Jules Joost Van Neerven

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT NL2007050202 de
09/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/129895de
15/11/2007

“POLIPEPTÍDEO, CORPO DE LIGAÇÃO, ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA, CULTURA DE CÉLULA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DE UM POLIPEPTÍDEO, UM CORPO DE LIGAÇÃO, UM ANTICORPO, UM ÁCIDO NUCLEICO E/OU UMA CÉLULA, E, MÉTODOS PARA MUNIR UM INDIVÍDUO COM UM ANTICORPO E PARA SELECIONAR UM ANTICORPO ANTAGONISTA DE CD40 ANTI-HUMANO”

A invenção diz respeito a anticorpos humanos, humanizados e monoclonais com imunogenicidade diminuída, usos e métodos de produção destes. A invenção, em particular diz respeito a anticorpos monoclonais CD40 anti-humano antagonísticos.

A molécula CD40 é uma glicoproteína de membrana tipo I de 50 kDa e é expressada nas células B, monócitos/macrófagos, células dendríticas (DCs) e células endoteliais ativadas.¹⁻⁶ Sob certas condições, a CD40 também pode ser encontrada em fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos.⁷ O ligando de CD40 (CD40L, CD154), uma glicoproteína de membrana integral do tipo II de 32 kDa, é transitoriamente expressada em células CD4⁺ T ativadas e uma população pequena de células CD8⁺ Células T ativadas.^{8, 9} Além disso, o CD40L foi observado em diversos outros tipos de células após a ativação, incluindo mastócitos, basófilos, células B, eosinófilos, DCs e plaquetas.^{10, 11}

Os estudos em modelos murinos demonstraram claramente o envolvimento da interação de CD40L-CD40 na patofisiologia de várias doenças autoimunes (para uma revisão, ver a referência¹²). Evidência de camundongo transgênico CD40L, que contraiu a doença do intestino inflamatório letal, forneceu a primeira evidência de interações de CD40-CD40L também deve desempenhar um papel na patogênese das doenças do intestino inflamatório.¹³ Um anticorpo monoclonal CD40L anti-camundongo

(Mab) evita eficazmente a inflamação da mucosa e produção de interferon- γ por CD4⁺ Células T *lamina propria* em colite induzida por TNBS.¹⁴ Em um modelo doença do intestino inflamatório no camundongo com uma Imunodeficiência Combinada Grave (SCID) mostrou que o tratamento com anti-CD40L do dia de reconstituição de célula T evitou completamente o aparecimento químico e histológico de colite experimental.¹⁵ Além disso, a administração de anti-CD40L a partir de 5 semanas após a reconstituição de célula T ainda pode evitar a progressão da doença e os animais tratados apresentaram melhora nos sintomas da doença e na histologia em comparação com animais de controle.¹⁶ Além disso, a reconstituição de camundongos com SCID com Células T de camundongos de nocaute CD40L, ainda demonstrou o papel essencial de células T que expressam CD40L no desenvolvimento da doença e produção de interleucina-12.¹⁶

A interação de CD40-CD40L pode ser antagonizada com anticorpos monoclonais (Mabs) contra CD40L ou CD40, A expressão de CD40L em plaquetas ativadas resultou em eventos trombo-embólicos durante o tratamento de seres humanos com CD40L Mabs anti-humanos de IgG₁ em níveis de dosagem mais altos e finalização do desenvolvimento destes Mabs.^{17, 19} A antagonização de CD40 portanto parece um método mais atrativo. A atividade antagonística não estimuladora de Mab 5D12 (CD40 anti-humano) foi demonstrada em vários estudos *in vitro* usando-se tipos de células que carregam CD40 diferentes^{20, 22} e atividade de antagonista de 5D12 quimérico (ch5D12) foram validados *in vivo* usando-se vários modelos de doença de primata não humano.^{23, 27} O ch5D12 é um anticorpo IgG4 humano molecularmente projetado contendo os domínios variáveis murinos das cadeias pesadas e leves de 5D12 e foi construído para reduzir o potencial de imunogenicidade e para intensificar a vida média *in vivo* do 5D12 Mab murino quando usado em seres humanos.

Pacientes com doença de Crohn sofrem de um distúrbio

inflamatório debilitante do trato gastrointestinal cuja etiologia e a patogênese precisa permanecem indefiníveis.^{28, 29} A doença é caracterizada por um

influxo na mucosa doente de células T inativadas, células B e macrófagos,^{30,}

³¹ A produção local de mediadores solúveis de inflamação e dano tecidos

5 envolvidos.^{28, 29} As células CD4⁺ T de mucosas e macrófagos e citocinas, tais

como o fator e necrose de tumor (TNF)- α e IL-12 foram mostradas

desempenhar um papel central na iniciação de um arco inflamatório na

doença de Crohn.^{32, 38} As células T de mucosa inflamada apresentam uma

capacidade proliferativa mais alta,^{28, 29} e secretam quantidades aumentadas de

10 IFN- γ e IL-2. Os níveis aumentados de transcrições de mRNA de citocina

associado com célula T foram observados em biópsias de mucosas de

pacientes com doença de Crohn.³³ Um papel dominante de CD40L nas células

de CD4⁺ T foi sugerido em nossos estudos na expressão de CD40/CD40L em

lesões da doença de Crohn.³⁹ CD40L pode mediar uma ativação forte de

15 células que carregam CD40, predominantemente células B e macrófagos,

desta maneira, resultando na produção aumentada de TNF- α e IL-12 em

lesões. Usando-se imuno-histoquímica, o manchamento aumentado com

5D12 foi observado em todas as amostras de áreas de doença de pacientes

com doença de Crohn em comparação com áreas não doentes. Os

20 manchamento duplo para CD40 e CD20 (células B) ou CD68 (macrófagos)

indicou que nas seções de pacientes com doença de Crohn, as células CD40⁺

foram principalmente as células B nos folículos linfóides e macrófagos na

lamina própria. As células T de própria Lamina da mucosa inflamada de

pacientes com a doença de Crohn induziram os monócitos a produzirem

25 quantidades significantes de IL-12 e TNF- α após 48 horas de co-cultura. A

adição de 5D12 resultou na produção de IL-12 e TNF- α reduzida; os níveis de

produção foram reduzidos aos níveis observados usando-se as células T de

própria lamina de controle tanto na ausência quanto na presença de IFN- γ .³⁹

É um objetivo da invenção fornecer moléculas alternativas que

compartilham pelo menos o tipo de segurança e/ou eficácia de 5D12 *in vivo*, não necessariamente a quantidade da dita segurança e/ou eficácia. O anticorpo 5D12, ou pelo menos os seus domínios variáveis, tem uma base de murino. A presente invenção fornece variantes dos domínios variáveis de cadeia pesada e leve de 5D12. Para este fim, a invenção fornece um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido da fórmula (I)

1 11 21 31
| | | |
GFSX₁S RYSVY WX₂RQP PGKGX₃ EWX₄GM MWGGG STDYS

41 51 61
| | |
TSLKS RLTIS KDTSK SQVX₅L KMNSL RTDDT AMYYC

71
|
VRTDG DY

em que:

X₁ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H;

X₂ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H;

X₃ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H;

X₄ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H e

X₅ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H.

O dito polipeptídeo compreende identidade de sequência extensiva com o domínio variável de cadeia pesada do anticorpo 5D12, entretanto, o polipeptídeo é menos imunogênico em um indivíduo humano

administrado como tal ou no contexto de anticorpo que compreende o dito polipeptídeo. Nas posições indicadas X₁ a X₅ diversos aminoácidos podem estar presentes como indicado. Uma molécula de ligação que compreende um polipeptídeo da invenção tem boas propriedades de ligação de CD40, Foi observado que a produção do anticorpo em uma célula varia, algumas vezes, com o tipo de aminoácido nas posições indicadas. Isto será detalhado, em outra parte, neste, abaixo.

A invenção ainda fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção compreendendo uma seqüência de aminoácido.

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETLSE TCTVS GFSX ₁ S RYSVY WX ₂ RQP			
41	51	61	71
PGKGX ₃ EWX ₄ GM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVX ₅ L KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS.			

O polipeptídeo mencionado acima, essencialmente estende-se sobre o domínio variável da cadeia pesada do anticorpo 5D12 de murino. A seqüência de aminoácido é alterada em diversas posições em diversas posições com respeito à seqüência de murino. O polipeptídeo alterado une boas propriedades de ligação, enquanto ao mesmo tempo é bem tolerado por humanos providos com o polipeptídeo. Nas posições indicadas vários aminoácidos podem ser inseridos sem reduzir e/ou alterar dramaticamente pelo menos as propriedades imunológicas do polipeptídeo quando comparado com o polipeptídeo murino original. É preferido que um polipeptídeo da invenção compreenda um G, A, V, L, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H na posição X₁. Desta maneira, pelo menos as propriedades de

produção do polipeptídeo em uma célula de mamífero não são reduzidas e/ou alteradas dramaticamente quando comparadas com o polipeptídeo murino ou quimérico original. Em uma forma de realização particularmente preferida

X_1 é G, A, V, L, P, F ou M;

5 X_2 é G, A, V, L, I, P, F ou M;

X_3 é G, A, V, L, I, P, F, M;

X_4 é G, A, V, L, I, P, F, M; e

X_5 é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T ou Y.

10 Estes polipeptídeos são melhor adaptados para a produção de nível alto em uma célula de mamífero. Particularmente, no contexto de um anticorpo.

A invenção ainda fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção, em que:

X_1 é G, A, V, L ou M;

15 X_2 é G, A, V, L, I ou M;

X_3 é G, A, V, L, I, P, F, M;

X_4 é G, A, V, L, I ou M; e

X_5 é P, F, W, N, Q, S, T ou Y.

20 Estes polipeptídeos são melhor adaptados à produção de anticorpo de nível alto enquanto, ao mesmo tempo apresenta boas propriedades de tolerância em um ser humano. A invenção ainda fornece um polipeptídeo da fórmula (I) em que X_1 é L; X_2 é I; X_3 é P; X_4 é M e/ou X_5 é S. Este polipeptídeo é particularmente preferido por causa de suas excelentes propriedades de produção no contexto de um anticorpo que imita a ligação e
25 as propriedades farmacológicas de anticorpo ch5D12 visto que as propriedades imunológicas são melhoradas em seres humanos quando comparadas com o anticorpo murino ou ch5D12 e em que pelo menos a produção do polipeptídeo não é dramaticamente reduzida quando comparada com a contraparte de murino ou quimérica.

A invenção ainda fornece um polipeptídeo da fórmula (I) em que X_1 é I; X_2 é V; X_3 é P; X_4 é M e/ou X_5 é S. Este polipeptídeo é particularmente preferido por causa de suas excelentes propriedades de produção no contexto de um anticorpo que imita a ligação e as propriedades farmacológicas de anticorpo ch5D12 visto que as propriedades imunológicas são melhoradas em seres humanos quando comparado com o anticorpo murino ou ch5D12 e em que pelo menos a produção do polipeptídeo não é dramaticamente reduzida quando comparada com a contraparte de murino ou quimérica.

Um anticorpo que desvia-se pelo menos em uma posição X_1 a X_5 quando comparado com o 5D12 quimérico nas posições correspondentes, tem propriedades imunológicas melhores do que o anticorpo 5D12 quimérico em seres humanos. Em uma forma de realização preferida de tais anticorpos a invenção preferivelmente fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção, em que: X_1 é I e X_2 é V; X_1 é I e X_2 é I; X_1 é L e X_2 é I; ou X_1 é L e X_2 é V. Os polipeptídeos são particularmente preferidos em combinação com um X_3 é P; X_4 é M; e X_5 é F ou S; Em uma forma de realização a invenção fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção, em que: X_1 é L; X_2 é V; X_3 é L; X_4 é L e X_5 é F. A produção de anticorpos compreendendo o dito polipeptídeo é muito boa, enquanto fornece-se simultaneamente propriedades imunológicas melhoradas em seres humanos em comparação com ch5D12. A invenção ainda fornece um polipeptídeo que compreende seqüência de aminoácido GFS X_1 S RYSVY WX $_2$ R, em que: X_1 é L e X_2 é I; ou X_1 é I e X_2 é V. Este polipeptídeo compreende um CDR1 modificado de um fragmento variável de cadeia pesada 5D12. Este CDR1 compreende pelo menos um aminoácido diferente quando comparada ao CDR1 do fragmento variável de cadeia pesada de anticorpo 5D12. Esta mudança de aminoácido leva tanto a propriedades imunológicas melhoradas de anticorpo 5D12 ou ch5D12 modificado em que a modificação compreende pelo menos uma substituição

da sequência correspondente do dito polipeptídeo em 5D12 ou ch5Dl2 com um polipeptídeo da invenção, visto que, ao mesmo tempo, permite a boa produção do anticorpo em uma célula de mamífero.

5 A invenção ainda fornece um domínio variável de cadeia pesada que compreende um polipeptídeo da fórmula (I). O dito domínio variável compreende preferivelmente de 90 a 130, mais preferivelmente de 100 a 120, mais preferivelmente de 105 a 115, mais preferivelmente 113 aminoácidos. O polipeptídeo pode ser gerado sinteticamente ou por uma célula. Preferivelmente, o dito domínio variável de cadeia pesada é produzido
10 por uma célula. Em estado natural, existem pelo menos cinco tipos de cadeia pesada: γ , δ , α , μ e ϵ , em que cada tipo define uma classe de imunoglobulinas. Um polipeptídeo da invenção pode ser usado como um corpo de ligação diretamente ou pode ser incorporado e, um anticorpo. Quando incorporado em um anticorpo, o polipeptídeo é preferivelmente combinado com uma parte
15 constante de uma cadeia pesada de anticorpo. Para este fim, a invenção ainda fornece uma cadeia pesada de anticorpo que compreende um polipeptídeo da fórmula (I). a técnica conhece muitos derivados e análogos de anticorpos de domínio variável. Entretanto, correntemente muitas partes, derivados e/ou análogos diferentes de anticorpos estão em uso.

20 Os exemplos não limitantes de tais partes, derivados e/ou análogos são, fragmentos Fv de cadeia simples, monocorpos, VHH, fragmentos Fab, proteínas de ligação artificiais, tais como, por exemplo, avímeros e outros. Um denominador comum de tais corpos de ligação específica é a presença de um domínio variável de cadeia pesada. Desta
25 maneira, a invenção ainda fornece um corpo de ligação que compreende um polipeptídeo da fórmula (I).

Um corpo de ligação preferido da invenção é um anticorpo, assim como um anticorpo compreende uma estrutura de ocorrência natural. Portanto, a invenção em uma forma de realização preferida fornece um

anticorpo que compreende um polipeptídeo de acordo com a invenção.

Um corpo de ligação de acordo com a invenção é preferivelmente um corpo de ligação que é bem tolerado em um animal. A tolerância de um animal a um polipeptídeo é governada por muitos aspectos diferentes. A imunidade, se esta mediada por célula T, mediada por célula B ou outro for uma das variáveis que são abrangidas em tolerância do animal a um polipeptídeo. Como mencionado acima, o anticorpo 5D12 tem uma base de murino. O polipeptídeo da fórmula (I) tem uma imunogenicidade reduzida em seres humanos. Isto, portanto, é referido algumas vezes como uma variante desimmunizada do domínio variável de cadeia pesada de 5D12. Desta maneira, em um aspecto, a invenção fornece um anticorpo que compreende uma especificidade de epítipo de um anticorpo de 5D12, em que a cadeia pesada do dito anticorpo é um polipeptídeo da fórmula (I). Desimmunizado como usado neste é definido como menos imunogênico em um animal do que o anticorpo original. Um polipeptídeo da fórmula (I) é desimmunizado quando comparado com a cadeia pesada em 5D12 através da remoção de epítopos de célula T humanos conhecidos. Os epítopos de célula T são seqüências de aminoácido dentro das proteínas com a capacidade de ligar-se às moléculas de classe II de MHC. Pela remoção dos epítopos de célula T, o anticorpo é menos imunogênico. Preferivelmente um domínio variável da invenção ainda é humanizado, tal como, por exemplo, incluído. Usando-se técnicas de inclusão, os resíduos exteriores que são facilmente encontrados pelo sistema imune são seletivamente substituídos por resíduos humanos para fornecer uma molécula híbrida que compreende uma superfície incluída fracamente imunogênica ou substancialmente não-imunogênica. Um animal como usado na invenção é preferivelmente um mamífero, mais preferivelmente um primata, mais preferivelmente um ser humano.

Um anticorpo de acordo com a invenção preferivelmente compreende uma região constante de um anticorpo humano. De acordo com

diferenças em seus domínios constantes de cadeia pesada, os anticorpos são agrupados em cinco classes ou isotipos: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas classes ou isotipos compreendem pelo menos uma das ditas cadeias pesadas que é denominada com uma letra grega correspondente. Em uma forma de

5 realização preferida a invenção fornece um anticorpo de acordo com a invenção em que a dita região constante é selecionada do grupo de regiões constantes IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, mais preferivelmente a dita região constante compreende uma região constante de IgG, mais preferivelmente uma região constante de IgG₁, preferivelmente uma região constante mutada

10 de IgG₁, mais preferivelmente a dita região constante é uma região constante de IgG₄. Além disso, a dita região constante de IgG₄ é preferivelmente um região constante de IgG₄ humana. Preferivelmente, o anticorpo IgG₄ da invenção compreende as regiões constantes da sequência de aminoácido de cadeia leve e pesada de aminoácido como descrito na figura 18.

15 Preferivelmente, o anticorpo IgG₄ anticorpo da invenção compreende a sequência de aminoácido de cadeia pesada e leve como descrito na figura 18. Alguma variação na região constante de IgG₄ ocorre em estado natural e/ou é deixada sem mudar as propriedades imunológicas do anticorpo resultante. Tipicamente entre cerca de 1 e 5 substituições de aminoácido são permitidas

20 na região constante. Um anticorpo com uma região de IgG₄ constante ou uma região constante mutada de IgG₁ tem pelo menos a maioria das propriedades farmacológicas de um anticorpo mas não liga-se completamente e, desta maneira, desta maneira não induzirá à depleção da célula, suas ligações in vivo. Preferivelmente, a dita região constante é uma região constante de um

25 anticorpo humano.

Em uma forma de realização a invenção fornece um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo de acordo com a invenção, e/ou um corpo de ligação de acordo com a invenção e/ou um anticorpo de acordo com a invenção. Um ácido nucleico como usado na invenção é tipicamente, mas

não exclusivamente um ácido ribonucleico (RNA) ou um ácido desoxirribonucleico (DNA). Os ácidos nucleicos alternativos estão disponíveis para uma pessoa habilitada na técnica, tal como, por exemplo, ácidos nucleicos de peptídeo (PNA). Um ácido nucleico de acordo com a invenção é, por exemplo, compreendido em uma célula. Quando o dito ácido nucleico é expressado na dita célula, a dita célula produz um polipeptídeo e/ou um corpo de ligação e/ou um anticorpo de acordo com a invenção. Portanto, a invenção em uma forma de realização fornece uma célula que compreende um polipeptídeo de acordo com a invenção, um corpo de ligação de acordo com a invenção, um anticorpo de acordo com a invenção e/ou um ácido nucleico de acordo com a invenção. A dita célula é preferivelmente uma célula animal, mais preferivelmente uma célula de mamífero, mais preferivelmente uma célula de primata, mais preferivelmente uma célula humana. Para os propósitos da invenção, uma célula adequada é qualquer célula capaz de compreender e, preferivelmente, de produzir um polipeptídeo de acordo com a invenção, um corpo de ligação de acordo com a invenção, um anticorpo de acordo com a invenção e/ou um ácido nucleico de acordo com a invenção.

A invenção ainda fornece uma célula que compreende um anticorpo de acordo com a invenção. Preferivelmente, a dita célula produz o dito anticorpo. Em uma forma de realização preferida, a dita célula é uma célula de hibridoma, uma célula de ovário de hamster chinês (CHO), uma célula de NS0 ou uma célula PERC6TM. Em uma forma de realização particularmente preferida, a dita célula é uma célula de CHO. Ainda é fornecida uma cultura celular que compreende uma célula de acordo com a invenção. Várias instituições e companhias desenvolveram linhagens celulares para a produção em grande escala de anticorpos, por exemplo, para o uso clínico. Os exemplos não limitantes de tais linhagens celulares são células de CHO, células de NS0 ou células PER.C6TM. Estas células também

são usadas para outros propósitos, tais como a produção de proteínas. As linhagens celulares desenvolvidas para a produção em escala industrial de proteínas e anticorpos ainda são referidas neste como linhagens celulares industriais. Desta maneira em uma forma de realização preferida, a invenção fornece o uso de uma linhagem celular desenvolvida para a produção em grande escala de proteína e/ou anticorpo para a produção de um anticorpo da invenção.

A invenção ainda fornece um método para produzir um anticorpo que compreende cultivar uma célula da invenção e colher o dito anticorpo da dita cultura. Preferivelmente, a dita célula é cultivada em um meio isento de soro. Preferivelmente, a dita célula é adaptada para o desenvolvimento de suspensão. Ainda é fornecido um anticorpo obtenível por um método para produzir um anticorpo de acordo com a invenção. O anticorpo é preferivelmente purificado a partir do meio da cultura. Preferivelmente, o dito anticorpo é purificado por afinidade.

Uma célula da invenção é, por exemplo, uma linhagem celular de hibridoma, uma célula CHO, uma célula de NS0 ou um outro tipo celular conhecido por sua adequabilidade para a produção de anticorpo para os propósitos clínicos. Em uma forma de realização particularmente preferida, a dita célula é uma célula humana. Preferivelmente, uma célula que é transformada por uma região E1 de adenovírus ou um equivalente funcional desta. Um exemplo preferido de uma tal linhagem celular é a linhagem celular PER.C6TM ou equivalente desta. Em uma forma de realização particularmente preferida a dita célula é uma célula CHO ou uma variante desta. Preferivelmente uma variante que faz uso de um sistema de vetor de glutamina sintetase (GS) para a expressão de um anticorpo.

Foi observado que alguns aminoácidos nas posições mencionadas X₁ a X₅ são menos adaptados para a produção de nível alto de um anticorpo que compreende um polipeptídeo da fórmula (I) em um

anticorpo que produz célula. Em uma forma de realização preferida um polipeptídeo da fórmula (I) no dito anticorpo compreende X_1 a X_5 em que:

X_1 é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H. Em uma forma de realização particularmente preferida X_1 é G, A, V, L, I, P, F ou M; X_2 é G, A, V, L, I, P, F ou M; X_3 é G, A, V, L, I, P, F, M; X_4 é G, A, V, L, I, P, F, M; e X_5 é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T ou Y. Mais preferivelmente, o dito anticorpo compreende um polipeptídeo da fórmula I em que X_1 é G, A, V, L, I ou M; X_2 é G, A, V, L, I ou M; X_3 é G, A, V, L, I, P, F, M; X_4 é G, A, V, L, I ou M; e X_5 é P, F, W, N, Q, S, T ou Y. Mais preferivelmente X_1 é L; X_2 é I; X_3 é P; X_4 é M; e/ou X_5 é S. Particularmente preferidos é quando X_1 é I e X_2 é V; X_1 é I e X_2 é I; X_1 é L e X_2 é I; X_1 é L e X_2 é L; X_1 é V e X_2 é I; X_1 é V e X_2 é V; X_1 é L e X_2 é L; X_1 é V e X_2 é L; ou X_1 é L e X_2 é V. Estes últimos polipeptídeos são particularmente preferidos em combinação com um X_3 é P; X_4 é M; e X_5 é F ou S, preferivelmente S; Em uma forma de realização a invenção fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção, em que: X_1 é L; X_2 é V; X_3 é L; X_4 é L e X_5 é F. A produção de anticorpos compreendendo o dito é boa, enquanto fornece-se propriedades imunológicas melhoradas em seres humanos em comparação com ch5D12.

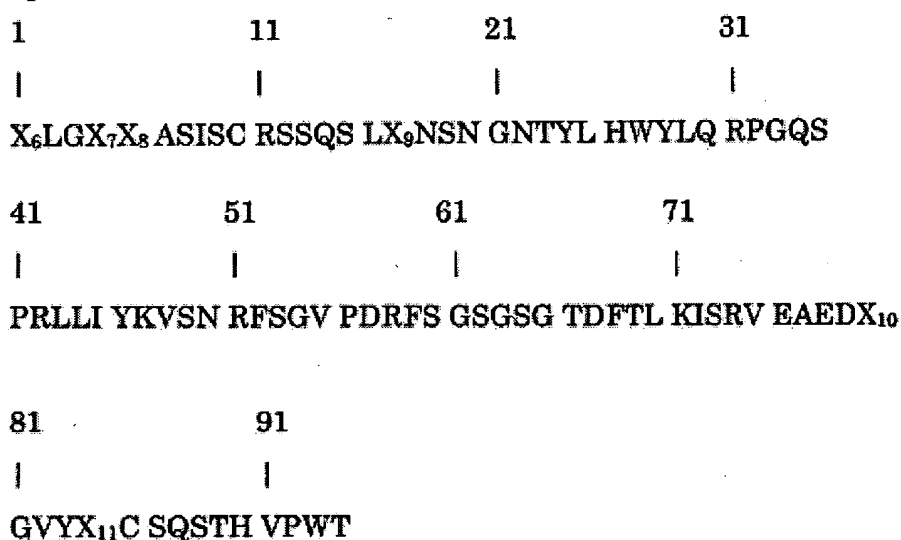
Em uma outra forma de realização preferida a invenção fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção em que pelo menos um de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ou X_5 é o mesmo como um aminoácido na posição correspondente em uma sequência que é mostrada pela invenção produzir especificamente bons níveis de expressão e em que ainda pelo menos um de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ou X_5 é o mesmo como um aminoácido na posição correspondente em uma sequência de 5D12 de aminoácido. Uma vantagem de um polipeptídeo de acordo com a invenção em que pelo menos um de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ou X_5 é o mesmo como um aminoácido na posição correspondente em uma sequência de 5D12 de aminoácido, é que um corpo de ligação de acordo com a invenção que compreende um tal polipeptídeo mostra um nível de

expressão melhor do que um polipeptídeo de acordo com a invenção em que num de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 ou X_5 são os mesmos como um aminoácido na posição correspondente em uma seqüência de 5D12 de aminoácido. Sem ligar-se por teoria, o dito melhor nível de expressão é acreditado ocorrer devido ao fato que um aminoácido na posição de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 e/ou X_5 contribui com uma montagem apropriada de um corpo de ligação de acordo com a invenção quando o dito aminoácido é o mesmo como um aminoácido na posição correspondente em uma seqüência de 5D12 de aminoácido.

Um anticorpo que compreende um polipeptídeo da fórmula (I) mostra atividade antagonística não estimuladora. Como a interação de CD40L a CD40 está envolvida na patofisiologia de vários distúrbios inflamatórios, tais como doenças autoimunes e rejeição a enxerto, um polipeptídeo de acordo com a invenção é, portanto, particularmente adaptado para melhorar um sintoma de um distúrbio inflamatório. Em uma forma de realização um anticorpo compreende um corpo de ligação da invenção. Em uma forma de realização preferida, o dito o dito anticorpo é um anticorpo monoclonal. A tecnologia de anticorpo monoclonal permite a produção de grandes quantidades de anticorpos essencialmente puros, desta maneira, obtendo-se produtos prognosticáveis. Portanto, a invenção em uma forma de realização fornece um anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico que compreende um polipeptídeo de acordo com a invenção. Um corpo de ligação de acordo com a invenção é todo aquele mais adequado para aquele propósito visto que este está em uma forma de realização desimunizada em comparação com um 5D12 de camundongo e/ou um 5D12 quimérico. Portanto, um corpo de ligação da invenção tem uma imunogenicidade reduzida e uma vida média intensificada em seres humanos em comparação com um 5D12 de camundongo e/ou um 5D12 quimérico. Como um resultado deste, um corpo de ligação da invenção tem um potencial farmacêutico sustentável contra vários distúrbios inflamatórios. Desta maneira, em uma forma de realização

preferida a invenção fornece um anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico desimunizado de acordo com a invenção.

Como referido previamente, a presente invenção fornece moléculas semelhantes a 5D12 que compreende alterações de aminoácido com respeito à sequência de aminoácido 5D12, em que as alterações estão, pelo menos, no domínio variável de cadeia pesada e, preferivelmente, também no domínio variável de cadeia leve. Neste contexto, a invenção ainda fornece um corpo de ligação de acordo com a invenção que compreende uma sequência de aminoácido da fórmula (II)



em que:

X₆ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H;

X₇ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H;

X₈ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H;

X₉ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H;

X₁₀ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H; e

X₁₁ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou

H.

O dito corpo de ligação é preferivelmente um anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico de acordo com a invenção. Em uma forma de realização preferida um X selecionado de X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} ou X_{11} é selecionado de um grupo parecido com um aminoácido em uma posição correspondente em uma seqüência 5D12 de aminoácido e/ou parecido com um aminoácido em uma posição correspondente em uma seqüência que é mostrada pela invenção para a produção de bons níveis de expressão, como mostrado no exemplo 2. Portanto, um corpo de ligação de acordo com a invenção preferivelmente compreende uma seqüência de aminoácido da fórmula (II) em que:

X_6 é N, Q, S, T, Y, W ou C;

X_7 é D, E, N, Q, S, T, Y, W ou C;

X_8 é N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W ou C;

X_9 é G, A, V, L, I, P, F, M;

X_{10} é G, A, V, L, I, P, F, M; e

X_{11} é N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W ou C.

Em uma outra forma de realização, a invenção fornece um anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico de acordo com a invenção que compreende um polipeptídeo da fórmula (II) da invenção que compreende uma seqüência de aminoácido como segue.

1	11	21	31
ELQLT QSPLS LPVX ₆ L GX ₇ X ₈ AS ISCRS SQSLX ₉ NSNGN TYLHW			
41	51	61	71
YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI			
81	91	101	111
SRVEA EDX ₁₀ GV YX ₁₁ CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR.			

Em uma forma de realização preferida a invenção fornece um polipeptídeo da fórmula (II) da invenção em que X_6 é T ou S, X_7 é D ou Q, X_8 é Q ou P, X_9 é V ou A, X_{10} é V ou L e X_{11} é F ou Y. Mais preferivelmente em que: X_6 é T, X_7 é Q, X_8 é P, X_9 é A, X_{10} é V e X_{11} é Y. Os anticorpos semelhantes a 5D12 compreendem um polipeptídeo da fórmula (I) e polipeptídeo preferido da fórmula (II) combina bons níveis de expressão em um que produz célula com boas propriedades de tolerância e propriedades farmacodinâmicas em um ser humano.

Um anticorpo do antagonista CD40 anti-humano da invenção preferivelmente compreende uma seqüência de aminoácido do domínio variável da cadeia pesada da fórmula (I) e uma cadeia leve variável à seqüência de aminoácido de domínio da fórmula (II). Um tal anticorpo tem como características. É claro, que é possível gerar variantes de um tal anticorpo original pela modificação de um ou mais aminoácidos neste. Muitas das tais variantes agirão mais ou menos similar quando comparada com a dita original. Tais variantes são também incluídas no escopo da invenção. Existem muitas vias para modificar um anticorpo da invenção. Um exemplo não limitante de uma tal modificação é um anticorpo que compreende um piroglutamato em vez de um glutamato. Outros exemplos não limitantes de tais modificações são um inserção, anulação, inversão e/ou substituição de um ou mais aminoácidos quando comparada com o dito anticorpo original. A presente invenção fornece meios e métodos para gerar uma tal variante. Esta também fornece testes para determinar como características de uma dita variante. Em uma forma de realização preferida a invenção fornece uma variante de um anticorpo original da invenção, a dita variante que compreende um inserção, anulação, inversão e/ou substituição de entre cerca de 1 a 10 aminoácidos quando comparada à seqüência de aminoácido do dito anticorpo original. Preferivelmente a dita inserção, anulação, inversão e/ou substituição não compreende os aminoácidos na posição X_1 e posição X_2 da cadeia pesada

de domínio variável da fórmula (I) do anticorpo original.

Em uma forma de realização preferida a invenção fornece um método para selecionar um anticorpo antagonista de CD40 anti- humano que compreende gerar uma primeira linhagem de célula que produza um anticorpo antagonista de CD40 anti-humano original e determinar a quantidade do anticorpo original que é produzido pela dita primeira linhagem de célula, o dito anticorpo original que compreende a seqüência de aminoácido do domínio variável da cadeia pesada

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL ₁ SI TCTVS GFSX ₁ S RYSVY WX ₂ RQP			
41	51	61	71
PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS			

em que X_1 e X_2 são em forma de par selecionados a partir do grupo que consiste de $X_1 = I$ e $X_2 = V$; $X_1 = L$ e $X_2 = I$; $X_1 = V$ e $X_2 = V$; $X_1 = L$ e $X_2 = L$; ou $X_1 = L$ e $X_2 = V$,

o dito método adicional que compreende gerar pelo menos uma outra linhagem de célula que produza uma variante do dito anticorpo original em que a dita variante de anticorpo é um anticorpo original modificado que compreende um inserção, anulação, inversão, e/ou substituição de entre cerca de 1 a 5 aminoácidos quando comparada com o dito anticorpo original, em que a dita modificação não consiste de uma modificação dos aminoácidos nas posições identificadas por X_1 e X_2 , e determinar a quantidade da variante de anticorpo que é produzida dito por pelo menos uma outra linhagem de célula,

o dito método adicional que compreende a seleção de uma variante de

anticorpo que foi produzida em uma quantidade que foi pelo menos 50% da quantidade de anticorpo original. Preferivelmente o dito anticorpo original compreende a seqüência de aminoácido de cadeia leve

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETLST TCTVS GFSX ₁ S RYSVY WX ₂ RQF			
41	51	61	71
PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS			

- A dita inserção, anulação, inversão, e/ou substituição de entre
- 5 cerca de 1 a 5 aminoácidos podem ser em qualquer parte do anticorpo não sendo ou envolvendo os aminoácidos nas posições X₁ e X₂. Preferivelmente, a dita inserção, anulação, inversão, e/ou substituição de entre cerca de 1 a 5 aminoácidos está na dita seqüência de aminoácido de cadeia pesada ou na dita seqüência de aminoácido de cadeia leve quando comparada à seqüência de
- 10 aminoácido de cadeia correspondente no dito anticorpo original. Preferivelmente a dita inserção, anulação, inversão, e/ou substituição de entre cerca de 1 a 5 aminoácidos está na dita seqüência de aminoácido de cadeia pesada quando comparada com a dita seqüência de cadeia pesada do dito anticorpo original. Preferivelmente o dito método adicional compreende gerar
- 15 uma linhagem de célula produtora de anticorpo que produza o dito anticorpo selecionado. Este produtor de linhagem celular pode ser ainda dito linhagem celular, ou ainda uma outra linhagem celular que produza o dito anticorpo selecionado. Preferivelmente o dito método adicional compreende a coleta do dito anticorpo selecionado. A invenção ainda fornece um anticorpo
- 20 antagonista de CD40 anti-humano isolado e/ou recombinante obtenível por um método de acordo com a invenção. Em uma forma de realização preferida

o dito anticorpo antagonista de CD40 anti-humano compreende uma modificação da sequência de aminoácido de cadeia pesada

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX ₁ S RYSVY WX ₂ RQP			
41	51	61	71
PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS			

em que X₁ e X₂ são em forma de par selecionados a partir do grupo que
 5 consiste de X₁ = I e X₂ = V; X₁ = L e X₂ = I; X₁ = V e X₂ = V; X₁ = L e X₂ = L; ou X₁ = L e X₂ = V,

a dita modificação que compreende uma inserção, anulação, inversão, e/ou substituição de entre cerca de 1 a 5 aminoácidos quando comparada com a dita sequência de aminoácido de cadeia pesada e em que a dita modificação
 10 não consiste de uma modificação dos aminoácidos nas posições identificadas por X₁ e X₂.

Em uma forma de realização a invenção fornece um composição farmacêutica que compreende um polipeptídeo de acordo com a invenção, um corpo de ligação de acordo com a invenção, um anticorpo de
 15 acordo com a invenção, um ácido nucleico de acordo com a invenção e/ou uma célula de acordo com a invenção. Também, a invenção fornece um polipeptídeo de acordo com a invenção, um corpo de ligação de acordo com a invenção, um anticorpo de acordo com a invenção, um ácido nucleico de acordo com a invenção e/ou uma célula de acordo com a invenção para o uso
 20 como um medicamento. Preferivelmente um medicamento para melhorar um sintoma de um distúrbio autoimune e/ou um distúrbio inflamatório e/ou para

reduzir rejeição a enxerto e/ou para o tratamento de cânceres positivos em CD40, Em uma forma de realização preferida o dito distúrbio autoimune e/ou um inflamatório é selecionado do grupo da doença do intestino inflamatório, artrite reumatóide, lupo eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase, penfigóides bolhosas e dermatite atópica.

Como um polipeptídeo de acordo com a invenção é particularmente apropriado para melhorar um sintoma de um distúrbio inflamatório desde que estas propriedades antagonistas CD40 não estimuladoras, um polipeptídeo de acordo com a invenção é adequado para melhorar um sintoma de diversos distúrbios. Um distúrbio inflamatório como usado na invenção é definido como qualquer doença que envolve um componente inflamatório. Para o interesse da invenção, um distúrbio inflamatório especialmente inclui um distúrbio autoimune e/ou rejeição a enxerto. O papel central da Interação CD40-CD40L na iniciação, amplificação e prolongação das respostas imunes feitas em um polipeptídeo da invenção especialmente adequado para modulação imune em um distúrbio autoimune.

Nesta informação abaixo é fornecida em CD40 e CD40L a fim de ilustrar o papel de CD40 e este ligando em distúrbios inflamatórios. A molécula CD40 é 50 kDa tipo I da glicoproteína de membrana e é expressada em células B, monócitos/macrófagos, e células dendríticas (DCs)⁴⁵⁻⁵⁰. Além disso, sob condições patológicas CD40 pode ser observada em células endoteliais (ECs), fibroblastos, células epiteliais e queratinócitos⁵¹. O ligando CD40 (gp39, TBAM, TRAP, CD40L, CD154), um 32 kDa tipo II de glicoproteína de membrana integral, é transitoriamente expressada em CD4+ células T ativadas e uma população pequena de CD8⁺ células T^{52, 53} ativadas. Além disso, CD40L foi observado em outros diversos tipos de células depois a ativação, incluindo mastócitos, basófilos, células B, eosinófilos, DCs e plaquetas^{54,55}.

A obrigação de CD40 e por CD40L dispararam um número de eventos biológicos nas células B incluindo proliferação, expressão de marcadores de ativação, produção de imunoglobulina (Ig), mudança de isotipo, adesão homotípica e resgate de apoptose^{56,57}. Entretanto, como descrito acima, a distribuição da molécula CD40 não é restrita às células B como foi originalmente presumida. Recentemente os monócitos humanos isolados expressam níveis baixos da molécula CD40, que pode ser super-regulada pela cultura na presença de IFN- γ ^{47-49,58}. A ligação CD40 de monócito/macrófago induz a secreção de grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios tal como IL-1, TNF- α e IL-12, que induz respostas inflamatórias e atividade tumoricida^{47-49,58}, e resgatando-os da apoptose⁴⁸. A ligação CD40 também causa DCs para intensificar sua diferenciação e ativação, para intensificar expressão de moléculas co-estimuladoras tal como CD86, CD80 e CD58, para aumentar a produção de citocina, e para inibir apoptose^{50,59}. Além disso, quando expressada sob condições inflamatórias, a sinalização CD40 pode induzir a expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1) e Selectina E em ECs⁵⁵. Estes resultados sugerem que a sinalização através de CD40 durante as Interações EC de célula T pode ser uma etapa importante na regulação da ativação EC e recrutamento de leucócito nos tecidos não linfóides. Estudos in vivo tem indicado a importância das interações CD40-CD40L na geração das respostas imunes humorais^{60,61}, na iniciação e ativação de células T específicas do antígeno⁶², na ativação temporal de macrófagos⁶³, tão bem quanto nas respostas imunes mediadas pela célula protetora através da Ativação de macrófago mediado pela célula T contra infecções de parasitas intracelulares tal como *Pneumocystis*, *Cryptosporidia*, e *Leishmania*⁶⁴⁻⁶⁶.

Um papel específico para CD40 e este ligando é demonstrado em modelos murinos de doença autoimune. Estudos de modelo de animal tem claramente indicado o envolvimento da interação CD40L-CD40 na

patofisiologia de várias doenças autoimunes. Nestes estudos, usando camundongos que sofre de doenças autoimune espontâneas ou experimental, interferindo com as interações CD40L-CD40 que tem claros efeitos benéficos. Um Mab por CD40L murino foi mostrado para evitar ou reduzir os sintomas das doenças em artrites induzidas por colágeno, encefalomielite alérgica experimental (EAE; um modelo de animal para MS), em camundongos com lupus (SWR x NZB)F1 e em camundongos diabéticos não obesos (NOD) que espontaneamente desenvolvem o Diabetes autoimune dependente da célula T. As evidências indicam que as interações CD40-CD40L também executam um papel na patogênese das doenças do intestino inflamatório, que inclui doença de Crohn e colite ulcerativa. Os camundongos transgênicos CD40L com números de cópias de transgene altos foram mostrados para adquirir a doença letal do intestino inflamatório marcada pela infiltração de células CD40⁺ e células T CD40⁺ nos tecidos doentes⁶⁷. O Mab anti-CD40L efetivamente previne a inflamação mucosal e produção de IFN- γ pela própria célula T CD4⁺ de lamina em animais com colite que foi induzido pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico⁴⁴. Mais recentemente uma comparação direta foi feita entre o tratamento anti-TNF α e interferência da via CD40-CD40L usando um Mab anti-CD40L em um camundongo SCID experimental do modelo da doença do intestino inflamatório. Neste modelo, células CD4+CD45RB^{alto} singenéticas são injetadas nos camundongos SCID que subsequentemente desenvolvem diarreia ou fezes moles e mostram perda de peso progressiva partindo de 3 a 5 semanas depois da Reconstituição da célula T, como sintomas da doença experimental do intestino inflamatório. O tratamento com anti-TNF- α ou anti-CD40L a partir do dia da reconstituição da célula T completamente preventiva clinicamente e de aparência histológica da doença experimental do intestino inflamatório. Além disso, a administração anti-CD40L a partir da semana 5 depois da reconstituição da célula T ainda pode evitar a progressão da doença e animais tratados

mostrando o melhoramento nos sintomas da doença e histologia comparada aos animais de controle (observações não publicadas).

O trabalho recente tem também demonstrado que a interferência com o caminho CD40-CD40L é fortemente imunossupressivo em modelos transplantados. O tratamento combinado com linfócitos pequenos alogênicos ou linfócitos pequenos esgotado de célula T mais um anticorpo para o camundongo CD40L permitindo uma ilha pancreática indefinida da sobrevivência de enxerto em 37 fora dos 40 recipientes que diferenciavam em local maior e menor de histocompatibilidade⁶⁸. A partir destes experimentos foi concluído que a interferência efetiva da interação CD40L-CD40 mais provavelmente resultou na prevenção da indução de moléculas co-estimuladoras nos pequenos linfócitos latentes pela célula T hospedeira alorreativa. Em outro estudo recente, foi demonstrado que a administração de um Mab para o camundongo CD40L no período de transplante prolongou notavelmente a sobrevivência de enxertos cardíacos murinos distintamente totais tanto em hospedeiros simples quanto sensibilizados. Entretanto, quando a terapia anti-CD40L foi atrasada até o pós-operatório do dia 5, anti-CD40L falharam em prolongar a sobrevivência do enxerto. Neste estudo, foi concluído que a terapia anti-CD40L inibiu a alorrejeição de um enxerto primariamente por interferir com ajuda da célula T por funções efetoras. Ainda foi mostrado que interferindo com vias CD80/CD86-CD28 e CD40-CD40L simultaneamente abortam eficazmente a expansão clonal em célula T in vitro e in vivo, promovem a sobrevivência de longo período de enxertos de pele alogênicos totais, e inibem o desenvolvimento da rejeição vascular crônico de aloenxertos cardíacos vascularizados primariamente. Além disso, interferindo com uma via CD40-CD40L, opcionalmente em combinação com interferência com uma via CD80/CD86-CD28, evitam a alorrejeição renal de um enxerto em um modelo de aloenxerto renal de macaco reso^{69,70}. Para informação adicional nos efeitos de 5D12 no distúrbio inflamatório, ver no

exemplo as referências 71 a 81,

5 A esclerose múltipla é uma doença autoimune do sistema nervoso central (cerebrospinal). Neste distúrbio, a substância branca das fibras nervosas adjacentes tornando-se endurecidas. O termo esclerose múltipla (MS) literalmente significa "muitas cicatrizes". As áreas endurecidas do tecido nervoso são denominadas placas. Os sintomas, severidade, e curso da esclerose múltipla são altamente variáveis, dependendo parcialmente nos locais das placas e a extensão da deterioração da substância branca. A deterioração da substância branca no sistema nervoso reduz os impulsos nervosos conduzindo à descoordenação do sistema nervoso.

10 Encefalomielite autoimune experimental (EAE) no sagüi comum (*Callithrix jacchus*) é um modelo pré-clínico útil da esclerose múltipla (revisado em 86, 87, 102, 104). As lesões da substância branca do sistema nervoso central (CNS) que desenvolvem em várias versões como características imunológicas, radiológicas, patomorfológicas da parte deste modelo EAE com MS^{95, 98, 101}. Visto que, o modelo EAE de sagüi pode formar uma ponte na ampla fenda imunológica entre humanos e roedores que impedem a seleção dos tratamentos promissores no tubo de desenvolvimento do medicamento em um estágio pré-clínico^{96, 99, 103}.

20 Os sagüis imunizados com rhMOG, uma proteína A recombinante que representa o fragmento extracelular do MOG humano (aminoácidos 1 a 125) desenvolvem EAE em 100% dos casos, que é devido à presença do elemento de susceptibilidade de classe II MHC monomórfico Caja-DRB*W1201 no repertório de cada macaco^{82, 84, 85, 107}. Um aspecto útil particularmente deste modelo pelo desenvolvimento da terapia é que as lesões desenvolvem na matéria branca do cérebro que pode ser visualizado e caracterizado tentativamente com técnicas de visualização de ressonância magnética relevante clinicamente^{92, 105}. A análise longitudinal das lesões da substância branca do cérebro com visualização da ressonância magnética

(MRI) mostrou um aumento progressivo do volume e atividade inflamatória persistente na maioria das lesões. Além disso, a caracterização da patologia CNS com MRI e critério histológico previamente descrito¹⁰¹ revelou que a maioria das lesões são em um estágio ativo precocemente¹⁰⁶.

5 O modelo EAE induzido por rhMOG foi usado para testar se as moléculas co-estimuladoras de alvejamento de anticorpo do antígeno presente nas células (APC) e células T que são um tratamento potencial para MS. A interação de CD40 com este ligando CD154 executa um importante papel em vários processos imunopatogênicos que operam em EAE, incluindo
10 a ativação da célula B, ativação da célula presente no antígeno (APC), iniciação das respostas da célula T específica por antígeno e indução de funções efectoras de macrófago^{90,93,97,7}. Um estudo realizado em 1996 confirmou que os camundongos tratados com um anticorpo contra CD154 são protegidos contra EAE⁸⁸. Entretanto, um processo clínico em pacientes MS
15 com anticorpo contra CD154 foi interrompido devido aos efeitos colaterais não esperados que não foram observados nos experimentos de animais¹⁷.

O anticorpo monoclonal de camundongo (Mab) 5D12 (mu5D12) foi fortalecido contra o CD40 humano. O anticorpo 5D12 parece um inibidor potente da ativação mediada por CD40–CD40L em diversos tipos
20 de células e, de modo diferente a maioria dos outros Mabs anti-CD40, não mostram atividade estimuladora CD40^{21,22,39}. Tanto o mu5D12 anticorpo humano anti-CD40 de camundongo quanto a versão quimérica deste anticorpo, ch5D12, apresentou efeitos supressivos fortes no desenvolvimento de lesões da substância branca CNS e deficiência neurológica no modelo EAE
25 de sagüi e mostrou nos efeitos colaterais marcados^{23,24}. Os mesmos estudos mostraram que o Mab anti-CD40 intravenosamente injetado nos Sagüis comuns afetados por EAE podem ganhar acesso às lesões da substância branca do cérebro onde as moléculas CD40 são proeminentemente expressadas em macrófagos infiltrados e microglia⁹⁵ ativada, como foi

observado precoce em MS⁸⁸. Este tem aumentado a questão se o ch5D12 também tem um efeito terapêutico em lesões já existentes.

5 't Hart et al monitorava o desenvolvimento da lesão do cérebro em 7 macacos imunizados com rhMOG pela visualização da ressonância magnética em série (MRI) em intervalos de 2 semanas⁷⁶. Os resultados deste estudo demonstrou a supressão da inflamação da lesão em todos os 3 macacos tratados com ch5D12 enquanto o aumento da lesão foi diminuída em 2 dos 3 macacos tratados com ch5D12.

10 A prevenção do compromisso CD40 com este ligando CD154 em células T ativadas precocemente no processo da doença tem um impacto significativo na expressão de EAE clínica e neuropatológica em roedores^{88,89,91,94,100} e modelos de primatas não humanos^{23,24}. CD40 é proeminentemente expressado dentro das lesões da substância branca CNS de pacientes MS tão bem quanto roedores afetados por EAE⁸⁸ e primatas não humanos⁹⁵. Que o CD40 carrega o APC dentro de CNS, tal como macrófago infiltrado tão bem quanto células glia perivasculares e parenquimal e contribuem significativamente à patogênese de EAE que g]foi elegantemente mostrada no osso de tutano dos camundongos quiméricos⁸³.

20 Os resultados de 't Hart et al, Laman et al, e Boon et al.^{76, 79, 81} indicam que o anticorpo bloqueado de CD40 é um tratamento potencialmente efetivo de MS. Importaneamente, o ch5D12 Mab não tem efeitos colaterais aparentes no modelo EAE de sagüi ou em outras espécies de primatas⁸⁰. O efeito clínico benéfico do anticorpo antiCD40 foi demonstrado em experimentos controlados por placebo em dois modelos EAE em sagüis, isto é 25 induzido com mielina humana⁷⁹ ou rhMOG⁸¹. Além disso, 't Hart et al tem mostrado um efeito inibidor do tratamento do anticorpo anti-CD40 em lesões já existentes⁷⁶.

A psoríase é uma doença inflamatória da pele que aflige 1 a 2% da população. Nesta doença, a células T e queratinócitos nas lesões são

marcadores de ativação ativados e expressados e as moléculas co-estimuladoras. Isto é através de algumas moléculas co-estimuladoras expressadas em queratinócitos e células T que interagem com cada uma outra e que estas interações contribuem para a atividade da doença ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Uma tal

5 série de moléculas podem ser CD40, que é expressada em queratinócitos ativados, e CD154 (o ligando CD40), que é transitoriamente expressado em CD4+ células T ativadas. A ligação CD40-CD 154 entre células T e queratinócitos pode ser liberada a partir destes mediadores inflamatórios celulares que são vistos em abundância em lesões psoriáticas. As interações

10 CD40, CD154, e CD40-CD154 foram recentemente revisadas¹¹¹.

Os queratinócitos de cultura também expressam CD40; a expressão é intensificada pelo tratamento IFN. A ligação do CD40 altamente expressado em queratinócitos tratados por IFN-gama (referido como CD40++ queratinócitos por todo este papel) com resultados de CD154 em super-regulação de ICAM e produção aumentada de citocinas ¹¹²⁻¹¹⁴.

15

Até agora, apenas um relato apareceu implicar esta ligação na patogênese de psoríase¹¹³. Os tipos de células que expressam CD40 em lesões psoriáticas não foram identificadas no último estudo e sua incidência e condição lesional não foi descrita. A presença de CD154+ células T em lesões psoriáticas não foi estudado. Deste modo, este permanece não conhecido se o CD154 atua como um dos sinais para a produção por queratinócitos de quimiocinas e complemento, que são observadas em abundância em lesões psoriáticas¹¹⁵.

20

Pasch et al recentemente demonstrou a presença e localização de células CD40+ e CD154+ pela imuno-histoquímica na pele lesional ou não lesional a partir de dez pacientes com psoríase¹¹⁶. A positividade aumentada pelo CD40 foi observado na quantidade dos queratinócitos, e alta expressão de CD40 foi mostrado em quase todas as células CD1a+ Langerhans em epiderme normal, lesional, e não lesional. Além disso, a alta expressão de

25

CD40 está presente em quase todas as células CD83+ em lesões psoriáticas; estas foram raramente vistas na pele não lesional e normal¹¹⁶. Também, uma pequena proporção de células T mostrou a expressão CD154, em mais pacientes em justaposição às células CD40+. Estes resultados aumentam a possibilidade que CD154+ células T possam ligar com queratinócitos CD40+, células Langerhans, e células dendríticas CD83+, e liberar mediadores a partir destes na lesão. Além disso, estes demonstram que a ligação CD40 induz a liberação de quimiocinas (IL-8, RANTES, e MCP-1)¹¹⁶. Na mesma publicação, Pasch et al. mostrou que a liberação relatada por CD40 de quimiocinas IL-8, MCP-1 e a uma menor extensão de RANTES foi inibida pelo anticorpo antagonístico anti-CD40 5D12¹¹⁶. Estes dados sugerem que o antagonista anti-CD40 mAb 5D12 pode pelo menos em parte ter um efeito na inflamação vista em lesões psoriáticas.

US2003/0165499 divulga um efeito anti-psoriático mensurável de 5D12 e outros anticorpos anti-CD40 antagonísticos em um camundongo SCID no sistema de modelo de transplante xenogênico que é usado como um modelo para tratamento de psoríase, mostrando que os anticorpos anti-CD40 antagonísticos podem ser usados para o tratamento de psoríase.

Um efeito terapêutico de 5D12 neste sistema in vivo foi demonstrado.

Em uma forma de realização particularmente preferida o dito distúrbio autoimune e/ou inflamatório compreende a doença do intestino inflamatório. Em uma outra forma de realização preferida um uso da invenção é fornecida em que a dita doença do intestino inflamatório compreende colite ulcerativa (UC) ou doença de Crohn (CD).

Como ilustrado acima, um polipeptídeo de acordo com a invenção é apropriado para o tratamento de diversos distúrbios inflamatórios, incluindo distúrbios autoimunes e rejeição a enxerto. Portanto, a invenção em uma forma de realização fornece um método para melhorar um sintoma de um

distúrbio autoimune e/ou um inflamatório e/ou para reduzir rejeição a enxerto. Ainda em uma forma de realização a invenção fornece o uso de um polipeptídeo de acordo com a invenção, um corpo de ligação de acordo com a invenção, um anticorpo de acordo com a invenção, um ácido nucleico de acordo com a invenção e/ou uma célula de acordo com a invenção para a fabricação de um medicamento para melhorar um sintoma de um distúrbio autoimune e/ou um inflamatório e/ou para reduzir rejeição a enxerto. Para melhorar um sintoma como usado na invenção é definido como melhora pelo menos de um sintoma de um distúrbio pelo menos parcialmente. A invenção é de interesse específico para distúrbios autoimunes e/ou inflamatórios para os quais, no presente, não existe nenhum tratamento eficiente. Exemplos destes distúrbios são artrite reumatóide, lupo eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase, doença do intestino inflamatório, penfigóides bolhosos e dermatite atópica. Um polipeptídeo de acordo com a invenção, opcionalmente compreende em um corpo de ligação ou uma célula da invenção e/ou codificado por um ácido nucleico da invenção, é especialmente apropriado para melhorar um sintoma de um distúrbio autoimune e/ou inflamatório como as propriedades definidas de um polipeptídeo de acordo com a invenção permitindo interferir com uma via CD40-CD40L em uma maneira específica. Além disso, visto que um corpo de ligação de acordo com a invenção é preferivelmente desimunizado, um corpo de ligação de acordo com a invenção está presente por um período sustentado de tempo e deste modo mostra esta atividade antagonizante em um paciente por um período de tempo considerável. Portanto, a invenção em uma forma de realização fornece um uso de um polipeptídeo de acordo com a invenção, um corpo de ligação de acordo com a invenção, um anticorpo de acordo com a invenção, um ácido nucleico de acordo com a invenção e/ou uma célula de acordo com a invenção para a fabricação de um medicamento para melhorar um sintoma de um distúrbio autoimune e/ou um distúrbio inflamatório e/ou para reduzir rejeição

a enxerto, em que o dito distúrbio autoimune e/ou inflamatório é selecionado do grupo de artrite reumatóide, lupo eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase, doença do intestino inflamatório, penfigóides bolhosos e dermatite atópica.

5 Breve descrição dos desenhos

A Figura 1, a concentração do soro ch5Dl2 depois da administração simples no dia 0 nos quatro níveis de dosagem como indicado pelo símbolos. Os valores são dados como μl de soro ch5Dl2/mL e foram determinados pelo ensaio imunossorvente ligado por enzima como detalhado na referência 27.

A Figura 2. Mudanças na contagem do índice de atividade da doença de Crohn (CDAI) durante o período de 28 dias depois da infusão ch5Dl2. A área dividida indica o período que os níveis ch5Dl2 excedem a concentração $10 \mu\text{g/mL}$ (ver também Figura 1) que foi observada ser um nível de soro antagonizante funcional em primatas²⁴⁻²⁷. No grupo 0,3 mg/kg, os níveis de soro nunca excederam o nível $10 \mu\text{g/mL}$.

A Figura 3, Contagem da atividade da doença histológica no dia 0 e dia 28. A contagem da atividade máxima é 16 e a contagem da atividade foi realizada de acordo com a referência⁴⁰. As amostras a partir do íleo (diamantes) de nove pacientes e amostras a partir do cólon (quadrados) de 11 pacientes foram obtidos no dia 0 e dia 28 e os resultados estão presentes por nível da dosagem de ch5Dl2 [(um) 0,3 mg/kg; (b), 1,0 mg/kg; (c), 3,0 mg/kg e (d), 10,0 mg/kg].

A Figura 4. A biópsia do cólon do paciente 012 (3,0 mg/kg) e a biópsia do íleo do paciente 011 (3,0 mg/kg) são mostradas como exemplos para a redução das respostas inflamatórias. As amostras foram manchadas com anticorpos que reconhecem todos os linfócitos T (CD3), células B (CD19), macrófagos (CD68) e células CD40(+) antes (a, c) e no dia 28 depois da administração ch5Dl2 (b, d). HE, hematoxilina-eosina.

A Figura 5. O DNA consensual e a seqüência de aminoácido deduzida do 5D12 VH murino e região VL.

A Figura 6. A comparação do aminoácido da região de murino V com regiões V embutidas e desimunizadas de 5D12.

5 A Figura 7. O alinhamento de 12 variantes de aminoácidos testados (Q5E, K13A, E16Q, T17S, I29L, I37V, P45L, M48L, STS60NSA, T68S, S79F, e T108S) de 5D12 VII desimunizado comparado com seqüência de murino precursora (ch5D12) e a seqüência desimunizada total (DI5D12).

10 A Figura 8. A análise de FACS usando células JY. O sobrenadante celular PER.C6 das variantes expressadas transitórias (Q5E, K13A, E16Q, T17S, I29L, I37V, P45L, M48L, STS60NSA, T68S, S79F, e T108S) de 5D12 foi coletado depois 48 horas. Como o controle também o sobrenadante foi coletado das células transfectadas com ch5D12 ou DI5D12 junto com o sobrenadante de células transfectadas de imitação (nenhum
15 plasmídeo). A ligação de anticorpos expressados foi testado por FACS usando células JY junto com anticorpo secundário rotulado por FITC anti-humano (1/100 diluído). Como o controle FACS as células JY foram incubadas com apenas o anticorpo rotulado FITC secundário.

20 A Figura 9. O alinhamento das variantes V-L-I adicionais em posições 29 e 37 (29I-37V, 29V-37I, 29I-37L, 29V-37V, 29L-37L, 29V-37L, 29L-37V) de 5D12 VII desimunizado comparado com a seqüência quimérica precursora (ch5D12), a seqüência totalmente desimunizada (DI5D12; 29I-37I) e PG102 (29L-37I).

25 A Figura 10. A distribuição da produtividade do anticorpo pela linhagem celular GS-CHO que produz o anticorpo PG102 e culturas de placa de 24 reservatórios 'enormes'. Diversas linhagens celulares são plotadas no eixo X, as faixas de concentração do anticorpo são plotadas no eixo Y (faixas de concentração de anticorpo são distribuídas em grupos de partida ascendentes a 0 a 25 ug/ml).

A Figura 11. Os perfis de desenvolvimento e acumulação do para a linhagem celular A) L107 (DC1; painel superior), B) L25 (DC2; meio do painel) e C) M95 (DC3; painel inferior) em cultura de frasco de agitação por batelada alimentada com CDACF.

5 A Figura 12. A comparação da ligação de PG102 (vermelho) e ch5Dl2 (PG100) (azul) a 10 $\mu\text{g/mL}$ pelo CD40 imobilizado em 3 níveis diferentes.

A Figura 13, a inibição da ligação de CD40 mAb pelas células JY que expressam CD40 humano pelo anti-idiotipo mAb 173-36-1, Os Mabs anti-CD40 foram submetidos a ensaio em uma concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Os dados indicam que \pm s.e. médio de 4 determinações separadas para cada anticorpo.

10 A Figura 14. ELISA CD40-Fc. A ligação relatada pela concentração de ch5Dl2 (PG100) e PG102 por CD40 humano-Fc. As placas foram cobertas durante a noite com 250 ng/ml de CD40 humano-Fc. O controle de isotipo mAb, chFUN-1, é direto contra CD86 humano. O dados indicam que \pm s.e. médio (todos $n=3$).

20 A Figura 15. A quantificação FACS da ligação anti-CD40 mAb por células JY. Os ch5Dl2 (PG100) e PG102 apresentaram concentrações de ligação metade-máxima comparável. O anti-CD86 mAb, chFUN-1, também mostrou ligação por células JY nestes experimentos devido à superfície da expressão de CD86 humano por esta linhagem celular. Os dados indicam que as determinações duplicaram para cada anticorpo.

25 A Figura 16. A inibição da ligação de ch5Dl2 (PG100)-PE e PG102-PE por células JY pelo anticorpos ch5Dl2 (PG100) e PG102 não rotulados. Os ch5Dl2 (PG100) (A) e PG102 (B) rotulados foram incubados a 1 $\mu\text{g/mL}$ na presença de concentração aumentada de anticorpo não rotulado de competição, ligação de anticorpo rotulado como determinado pelo meio de intensidade de fluorescência (MFI) pela citometria de fluxo. O MFI máximo

para a ligação ch5D12 (PG100)PE e PG102PE foi 369 unidades de fluorescência (A) e 305 unidades de fluorescência (B), respectivamente. Os dados indicam que \pm s.e. médio de 4 experimentos separados.

5 A Figura 17. A inibição de IL-8 liberado pelas células THP-1 depois da co-cultura com células Jurkat. As células THP-1, pulsadas com IFN-gama, são co-cultivadas com células Jurkat na presença de concentrações aumentadas de ch5D12 (PG100) ou PG102. A liberação IL-8 a partir de células THP-1, induzidas pela ligação de células Jurkat à células THP-1 por intermédio de CD40-CD40L, foi medido por ELISA. Os dados indicam os
10 resultados a partir de um experimento simples.

A Figura 18. O ácido nucleico e a seqüência de aminoácido de um cadeia IgG₄ PG102 pesada e leve.

Exemplos

Exemplo 1

15 *Materiais e métodos*

Dezoito pacientes adultos (18 a 60 anos de idade) com um diagnóstico clínico de doença de Crohn confirmada pela evidência radiológica, endoscopia ou histológica, e com uma contagem de índice da atividade da doença de Crohn (CDAI) de pelo menos 220 mais não mais do
20 que 450 (contadas em 7 dias antes de estudar a administração do medicamento) foram selecionados para inclusão no estudo. Os pacientes foram deixados para ter os seguintes tratamentos antes e durante o estudo; o tratamento de mesalamina por 8 ou mais semanas com a remanescente dosagem estável por 4 semanas antes da avaliação; um máximo de 30 mg de
25 corticoesteróides por dia (ou 9 mg de budesonida por dia) por 8 ou mais semanas, com a remanescente dosagem estável a 2 semanas antes da avaliação; mercaptopurina ou azatioprina por 4 ou mais meses com uma remanescente dosagem estável por 8 semanas antes da avaliação. Os pacientes não devem ter recebido o tratamento com ciclosporina A ou metotrexato

dentro de 3 meses antes da avaliação não foram estes deixados ter exposição antes do tratamento com Mabs. A idade média de todos os pacientes registrados foi de 35,8 anos dos quais sete foram machos e 11 foram fêmeas. Todos os pacientes foram da etnia caucasiana. Nenhuma diferença aparente entre os pacientes nos grupos diferentes em inclusão foram observados (Tabela 1), com a exceção que nos grupos de três dosagens inferiores a maioria dos pacientes foram fêmeas, enquanto o maior grupo de dosagem (10,0 mg/kg) consistiu de apenas pacientes machos. Aqui não foi notado diferenças entre os quatro grupos com respeito a um eletrocardiograma de linhagem de base (ECG), sinais vitais, exames físicos, sinais de histórico da doença de Crohn e sintomas, e valores de laboratório de linhagem de base. Aqui não tiveram diferenças significantes que diz respeito às características da linhagem de base entre os quatro grupos de dosagem. O grupo de dosagem mais alto entretanto também mostrou a contagem CDAI mais alta em linhagem de base. Este estudo foi aprovado pelo Medical Ethical Boards da University Hospitals Leuven, Belgia, Leiden University Medical Center, Países Baixos, Medizinische Klinik, Kiel, Alemanha, e Hadassah Medical Center, Jerusalém, Israel. Todos os pacientes dão permissão para o estudo.

Projeto do estudo e protocolo de tratamento

O ch5D12 é um anticorpo IgG4 humano projetado molecularmente contendo os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves de versão precursora Mab 5D12. Este Mab foi mostrado por ligar às células de carregamento CD40 e por antagonizar ativação mediada por CD40 de várias células²⁰⁻²⁷. O ch5D12 foi administrado em um rótulo aberto, dose simples, teste de multi-centro, estudo dos níveis de quatro doses. Aqui foram cinco pacientes em cada grupo de tratamento exceto pelo grupo de dosagem final em que apenas três pacientes foram registrados. A administração simples em níveis de dosagem de 0,3, 1,0, 3,0, e 10,0 mg/kg de ch5D12 foi feito intravenosamente. Depois o recrutamento completo em um grupo de

dosagem, o recrutamento no próximo grupo apenas foi começado quando a segurança foi estabelecida no nível de fluxo de dosagem. A atividade clínica da doença foi avaliada em cada uma visita semanalmente pelo primeiro período do dia 28 e uma última visita subsequente no dia 56. Dois pacientes (3,0 mg/kg grupo de dosagem) retiraram-se do estudo depois do dia 28 determinado mais estes dados são incluídos na avaliação. Os pacientes foram deixados estáveis na mesma dosagem de sua medicação corrente durante o curso do estudo. Nenhuma medicação não permitida de acompanhamento foi usada durante o estudo. As respostas ao tratamento ch5D12 foi definido como uma diminuição em CDAI de ≥ 100 pontos e remissão da doença clínica foi definido como um CDAI de ≤ 150 (contagem total) e uma diminuição de CDAI de pelo menos 100. Todos os pacientes que sofreram de uma endoscopia na avaliação e no dia 28 ($n = 11$) foram analisados por uma diminuição em seu índice de contagem da severidade do índice endoscópico da doença de Crohn (CDEIS). As biópsias foram retiradas destes pacientes 11 antes e no dia 28 depois da administração ch5D12 por histopatologia e imuno-histoquímica. A segurança nas avaliações incluem exames físicos, sinais vitais, ECG, e dados de laboratório (químico, hematologia e análise da urina) incluindo, anti-dsDNA, pANCA, e avaliações de anticorpo anti-quimérico humano (HACA). O HACA foi determinado pelo ensaio imunossorvente ligado por enzima (ELISA) como explicado na referência. (27).

Farmacocinéticos

As concentrações do soro de ch5D12 foram determinadas por ELISA como previamente descrito²⁷. Para determinar o revestimento de CD40 pelo ch5D12 injetado, o sangue foi coletado em tubos de heparina e diluídos em duas partes em PBS. As células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) foram isoladas pela centrifugação gradiente (Lymphoprep, Nycomed, Roskilde, Denmark) e 500 000 células foram manchadas com ch5D12 rotulado por FITC e anti-CD20 rotulado por PerCP

(Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) e incubados em gelo por 30 minutos. Como um controle de fundamento pela ligação 5D12-FITC, um tubo separado de PBMC foi manchado apenas com anticorpo anti-CD20 rotulado por PerCP. Os anticorpos não ligados foram lavados até o fim, e as células foram analisadas usando um citômetro de fluxo (FACSort; Becton-Dickinson). A aquisição de eventos foi conduzido pela barreira e adquirindo as células que expressam CD20 por um total de 5000 eventos. Se diversas células que expressam CD20 for inferior por uma série de amostra, o cuidado para retirar e adquirir o mesmo número de eventos tanto na preparação manchada quanto na preparação não manchada.

Histologia e imuno-histoquímica

As biópsias mucosais a partir do íleo e do cólon obtidas durante a ileocolonosopia antes do tratamento no dia 0 e no dia 28 com uma pinça padrão que foi fixada em formalina a 6% para análise de rotina. As amostras adicionais foram imediatamente congeladas por ruptura no composto da temperatura de corte ótima Tissue-Tek (Miles Laboratories Inc, Naperville, IL, USA) em isopentano esfriado por nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas a -80°C até o uso adicional. As amostras fixadas de formalina foram rotineiramente processadas por parafina. As seções de espessura de cinco micrômetro foram preparados e manchados com hematoxilina e eosina. As seções foram analisadas usando um microscópio Leitz Wetzlar (Wetzler, Alemanha). Um total de quatro seções semi-seriais para cada amostra foram analisadas. As amostras congeladas foram usadas para análise imuno-histoquímica, que foi realizada usando um painel de Mabs para avaliar a presença de sub-séries diferentes dos linfócitos e monócitos/macrófagos. O painel foi completado com Mabs direto contra CD40 e CD40L. O manchamento imuno-histoquímico foi realizado em seções *cryostat*, secadas durante a noite em temperatura ambiente, e fixada na acetona absoluta por 10

minutos. Os dispositivos re-hidratados foram incubados por 30 minutos com os seguintes Mabs; CD3 (clone: UCHT1, 1/10 diluição) (Dako, Glostrup, Denmark), CD4 (clone: MT310, 1/10 diluição) (Dako), CD8 (clone: 144B, 1/20 diluição) (Dako), CD19 (clone: HD37, 1/30 diluição) (Dako), CD40 (clone: 5D12, 1/100 diluição) (PanGenetics, Amsterdam, Países Baixos), CD68 (clone: KO, 1/50 diluição) (Dako), CD154 (clone: M90, 1/10 diluição) (Serotec, Oxford, UK). O Mab secundário foi uma imunoglobulina anti-camundongo rotulada por biotina (1/400 diluição; Dako) aplicada por 30 minutos. Para peroxidase endógena de bloqueio eficiente, as seções foram também incubadas em solução de metanol contendo 0,3% (v/v) H₂O₂ por 20 minutos. Depois três lavagens com PBS, o complexo rotulado por peroxidases de avidina/biotina (Dako) foi adicionado. Entre as incubações, as seções foram lavadas em solução salina tamponada por fosfato ao pH 7 por 15 minutos. O produto da reação foi visualizado pela incubação da seção por 10 minutos em 0,05 M de tampão de acetato ao pH 4,9, contendo 0,05% de 3-amino-9-etil-carbazol (Janssen, Beerse, Belgium) e 0,01% de H₂O₂, resultando em um local imunorreativo vermelho claro. Subseqüentemente, os dispositivos foram fracamente contra-manchados com hematoxilina de Harris, enxaguada com água destilada e uma combinação coberta foi aplicada com glicerol. Os controles, que foram negativos, consistiram de uma omissão de um anticorpo primário e secundário, o uso de cromogênio sozinho, e o uso de IgG de camundongo pontuados por isotipo irrelevante (vimentina; Dako).

As seções de parafina manchadas com hematoxilina e eosina, foram todas analisadas pelo mesmo patologista (K.G.) ligadas pela origem das amostras. A atividade da doença foi avaliada usando uma contagem numérica histológica⁴⁰ de que a atividade máxima corresponde a 16. As seções manchadas imuno-histoquimicamente foram também analisadas em uma

maneira ligada. Para 15 séries de biópsias, as células manchadas positivamente foram contadas em campos de força altos (amplificação x40). Os campos foram escolhidos de acordo com a densidade mais alta de células estromais. O número foi expressado como uma porcentagem do total de diversas células mononucleares no estroma. Estas contas foram usadas para a construção de um sistema de contagem pelo qual a intensidade das células manchadas positivamente foi sub-dividida em quatro categorias: -, +/-, + e ++. O valor normal para CD3+, CD4+, CD8+, CD19+ e CD68+ tanto para o íleo quanto para o cólon é +. O valor normal para as células CD40+ e CD154+ é negativo (-).

Parâmetros de segurança imunológicos

Para avaliar qualquer imunossupressão não específica por ch5D12, a proliferação de células T sanguíneas periféricas em resposta ao mitogênio fitoemaglutinina (PHA) foi avaliado. A estimulação de PHA (1 µg/mL) foi realizada em PBMV isolado como previamente relatado.⁴¹ Além disso, as porcentagens das células CD3+, CD4+, CD8+ e CD20+ circulantes foram medidas para excluir a depleção de células circulantes. Para a citometria de fluxo, o sangue foi coletado em tempos indicados em tubos de heparina, de que 100 µL de sangue total em cada tubo testado foi manchado como os seguintes (todos os Mabs foram adquiridos de Becton-Dickinson): anti-CD3-FITC, anti-CD19-PE, anti CD45-PerCP, anti-CD45-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-PE e anti-CD14-PE. As células manchadas foram então analisadas em um citômetro de fluxo FACScan (Becton-Dickinson). Este protocolo foi conduzido para cálculo da razão de células CD4+ a CD8+ e para determinar a proporção de células B dentro da população linfocítica. As porcentagens relatadas por CD3 e CD19 foram as porcentagens das células T e células B dentro da população linfocítica, considerando, as células CD4 e CD8 que foram relatadas como as porcentagens das células CD3. Apenas CD14 (população monocítica) é mostrada como uma porcentagem da

população CD45 total.

Resultados

Farmacocinética

Os meios dos níveis de picos de ch5D12 depois uma injeção intravenosa simples foram dependendo da dosagem e proporcional a dosagem (Figura 1). Depois de 24 horas, aproximadamente 50% do ch5D12 administrado deve ser detectado em soro no maior dos três grupos de dosagem. Para o grupo 0,3 mg/kg, apenas 15% está presente em soro depois de 24 horas. A partir de estudos de primatas não humanos, um $t_{1/2\beta}$ de 8 a 10 dias foi calculado²⁷ que foi confirmado pelo dado humano corrente. O revestimento completo de CD40 em células B sanguíneas periféricas não foi atingido pela infusão de 0,3 mg/kg como determinado por um ensaio de competição ex vivo usando ch5D12 rotulado por FITC (não mostrado). Para o grupo 1,0 mg/kg, aproximadamente 1 semana de revestimento de CD40 em células B circulantes devem ser observadas, enquanto nos dois maiores grupos de dosagem este período aumentou por 2 a 3 semanas. Isto indica que no grupo de dosagem inferior, o antagonismo de CD40 foi incompleto, enquanto o antagonismo completo foi atingido no grupo 1,0 mg/kg por 1 semana e ainda mais longo nos maiores grupos de dosagem.

20 *Respostas clínicas*

A análise da evolução CDAI indica que 13 dos 18 pacientes (72%) experimentaram uma resposta favorável depois da infusão ch5D12. Similarmente, quatro dos 18 pacientes (22%) experimentaram uma remissão durante aquele período. Quando avaliado no dia 21, uma resposta favorável foi registrada em 10 dos 18 pacientes. Os grupos 2 e 4 mostraram o meio de diminuição maior em CDAI, e nenhuma relação clara efeito-dosagem foi observada (Figura 2; Tabela 2). Uma medição repetida pos-hoc anova mostrou uma diminuição significativa estatisticamente em CDAI no dia 56 do período de observação ($P < 0,001$). A diferença entre os grupos não foi

significante estatisticamente. Apenas nos grupos 3 e 4, CDEIS deve ser avaliado (como a endoscopia foi realizada em apenas três pacientes no grupo 1 e 2). No grupo 3, dois dos cinco pacientes tem uma diminuição em CDEIS, considerando no grupo 4, dois de três pacientes tem uma diminuição. Os 5 pacientes remanescentes nestes dois grupos não mostraram mudança (não mostrado).

Mudanças histológicas

Nos pacientes a partir do qual as biópsias foram retiradas (n = 11), um investigador simples realizado na avaliação das mudanças na 10 histopatologia e imuno-histoquímica. As avaliações realizadas no material da biópsia mostrou uma influência clara no tratamento da atividade microscópica da doença tão bem quanto na intensidade do infiltrado da célula mononuclear da própria lamina.

A mudança a partir da linhagem de base por histopatologia no 15 dia 28 e a contagem da atividade é mostrada na Figura 3. As amostras a partir do íleo de nove pacientes e as amostras a partir do cólon de 11 pacientes no dia 0 foram disponíveis. No quatro casos, o íleo não foi envolvido na avaliação enquanto cinco pacientes tem doença ileal ativo. O meio da contagem da histologia no dia 0 por aquele com doença ativa foi de 4,6 (faixa de 3 a 7). O meio da contagem da histologia pelos cinco pacientes diminuem 20 a 1,0 (faixa de 0 a 3) no dia 28. No quatro dos 11 pacientes, o cólon não foi envolvido no dia 0 e as amostras colônicas a partir destes pacientes permaneceram normais no dia 28. Em sete pacientes o cólon foi claramente envolvidos com um meio de contagem da histologia no dia 0 de 4,5 (faixa de 25 2 a 12). Esta diminuição no dia 28 por um meio de contagem de 1,7 (faixa de 0 a 7). No cinco dos sete pacientes, a contagem no dia 28 foi 0 indicando uma biópsia normal ou 1 indicando apenas anomalias arquiteturais. No menor grupo de dosagem (painel um), a contagem colônica de um paciente diminuiu, mas a outra contagem colônica neste grupo permaneceu alta e a contagem do

íleo ainda aumentada. Nos maiores grupos de dosagem (painéis b-d), o íleo ou cólon ou ambos diminuíram na contagem da atividade no dia 28 depois do tratamento com ch5D12. Conclusivamente, uma resposta positiva [como definido na referência (41)] foi observado em 81% (9/11) dos pacientes. Além disso, os sete pacientes com doença ativa no dia 0 mostrou redução da atividade de neutrófilos ao ponto que os neutrófilos não estão presentes em suas biópsias no dia 28.

Para avaliar que as células foram alvejadas pelo tratamento com ch5D12, uma avaliação imuno-histoquímica foi realizada por protocolo nas biópsias disponíveis usando marcadores de célula T (CD3, CD4 e CD8) e célula B (CD19) e um marcador de macrófago (CD68). Os Resultados são listados na Tabela 3, nenhuma redução foi observada no dia 28 no menor grupo de dosagem enquanto em todos os outros grupos a infiltração diminuída foi observada. Nas amostras a partir do íleo em linhagem de base, existe um aumento do número de CD3+ célula T em seis de nove casos. No cólon, um aumento no número de CD3+ célula T está presente em quatro dos 11 pacientes, todos dos quais também tem a doença ativa em histologia de rotina. No dia 28, os números de CD3+ célula T tem normalizado em todos mais um paciente. Neste paciente (paciente 001; grupo menor de dosagem; 0,3 mg/kg) existe um aumento persistente CD3+ célula no íleo e cólon, em paralelos com a atividade inflamatória persistente e histologia de inflamação granulomatosa e de rotina. As células CD4+ e CD8+ seguidas por um precursor similar como CD3+.

O precursor para a CD19+ células B foi comparado com aquele observado pela célula T. No dia 0, existe uma elevação das células B em seis dos nove pacientes pelo qual as biópsias de íleo foram disponíveis e no quatro dos 11 amostras a partir do cólon. No dia 28, a quantidade das células B tem normalizado em todos os casos exceto por um paciente a partir do grupo inferior de dosagem.

Uma diminuição similar no dia 28 foi observado pelas células CD68+ monócitos/macrófagos. No dia 0, existe um aumento na quantidade de células CD68+ monócitos/macrófagos em cinco dos nove pacientes pelo qual as biópsias de íleo foram disponíveis e no quatro dos 11 amostras a partir do cólon. Mais uma vez a diminuição tem normalizado no dia 28, exceto por um paciente do grupo inferior de dosagem que permanece alto pelas células CD68+ monócitos/macrófagos na amostra colônica e ainda um aumento na biópsia de íleo, que mostra este paciente que ainda tem a doença ativa no dia 28.

A Figura 4 mostra exemplos representativos da diminuição de todos os três maiores tipos de células (Células T, Células B e células monócitos/macrófagos) em biópsia do íleo do paciente 011 (a contagem da atividade: 7) e biópsias colônicas do paciente 012 (a contagem da atividade: 12) antes da administração de ch5D12 e no dia 28 depois da administração de ch5D12.

Segurança

Nos pacientes retirados do estudo porque os eventos adversos (AEs) com a maioria destes AEs sendo suave para moderar na severidade. Uma avaliação de AEs ocorre em $\geq 5\%$ do número total de AEs revelando a pirexia sendo AEs mais comum, artralgia, mialgia e dor de cabeça. Artralgia, ocorre freqüentemente ambos em linhagem de base e durante o período de acompanhamento, diminuição na freqüência no curso do período de acompanhamento. Sintomas semelhantes a gripe e erupções pruríticas ocorrem em quatro pacientes, do qual apenas um paciente experimenta um início de erupção moderada curta depois do estudo da administração do medicamento (3,0 mg/kg). Em toda parte, não existe uma resposta de dosagem clara para qualquer AE simples, com a exceção possível da dor de cabeça/enxaqueca.

Existem seis sérios efeitos adversos (SAEs) notado em seis

pacientes; no eventos ocorrido no grupo 0,3 mg/kg, três eventos no grupo 1,0 mg/kg grupo, dois eventos no grupo 3,0 mg/kg e um evento no grupo 10,0 mg/kg. Os cinco dos seis SAEs foram considerados possíveis no estudo do medicamento relatado, um evento não foi considerado relatado. Todos mas
5 um evento foram eventos gastrintestinais (dois sub-íleos ambos em 1,0 mg/kg; duas doença de Crohn agravadas, pacientes 1,0 e 3,0 mg/kg; e uma dor abdominal agravada em um paciente 3,0 mg/kg). Dois destes eventos entretanto, ocorrido em um tal ponto de tempo que uma conexão casual ao estudo do medicamento é muito improvável (um paciente no dia da infusão e
10 um outro paciente depois da endoscopia sofrida no dia 29 depois do estudo da administração do medicamento). Uma das anomalias observadas aparecem nos estudos dos medicamentos ou doses relatadas.

Parâmetros de segurança imunológicos

Como ch5D12 inibe a ativação da célula B in vitro, níveis de
15 imunoglobulina total foram determinados e observados a serem estáveis no curso do período de acompanhamento. Para excluir a possibilidade que ch5D12 é capaz de esgotar as células B a partir da circulação realizamos sub-séries de análise de PBMC no curso do estudo. As porcentagens e números absolutos de células positivas CD3, CD4, CD8 e CD14 não foram afetadas
20 pela administração de ch5D12. As contas absolutas de CD19+ células B transitoriamente corrente diminui brevemente depois da administração ch5D12 e registrou os seus valores originais depois de ch5D12 foi clareado a partir da circulação (não mostrado).

Para o estudo se o tratamento com ch5D12 causaria um efeito
25 supressivo imune geral, o PBMC isolado em vários pontos de tempo antes e depois do tratamento foram estimulados pela célula T policlonal ativadora de PHA. Infelizmente, as células do grupo de dosagem 10,0 mg/kg não foram congeladas apropriadamente e foram portanto incapaz de responder ao PHA, incluindo as células obtidas antes da administração de ch5D12. O índice de

estimulação induzido pela incubação com PHA foi altamente variável mas também não tem direção de uma diminuição depois do tratamento ch5D12 ser detectado (dados não mostrados).

Os anticorpos anti-ch5D12 não foram detectados em dois grupos de dosagem inferiores em toda parte do estudo completo. No grupo 3,0 mg/kg, um paciente foi observado para ter montado uma resposta anti-ch5D12, apesar do sinal ser muito baixo e deve ser apenas detectado na amostra não diluída no dia 28 deste paciente. No maior grupo de dosagem, um outro paciente tem anticorpos anti-ch5D12 no dia 28 e dia 56 do estudo. Este deve ser detectado com uma diluição de 1:64. Portanto, apenas dois pacientes tem uma resposta imune possível a administração ch5D12.

Discussão

Neste rótulo aberto, o teste multi-centro, quatro níveis de dosagem de ch5D12 foram administrados aos pacientes com moderação pela grave doença de Crohn. Dezoito pacientes foram registrados, com cinco pacientes em cada grupo de tratamento exceto pelo grupo de dosagem final em que apenas três pacientes foram registrados. O ch5D12 dos níveis de soro aumentaram dependendo da dosagem e da longa vida média do soro que foi observado em macacos cinomolgos²⁷ e foi confirmado em humanos. Este estudo mostra a possibilidade da ativação celular mediada por CD40 antagonizante usando ch5D12, na ausência de maiores efeitos colaterais. A análise CDAI indica que 72% dos pacientes experimentaram uma resposta clínica e 22% experimentaram uma remissão durante o estudo. Estes resultados são promissores; entretanto o projeto de rótulo aberto e a ausência de um grupo de controle feito é impossível definitivamente atribuir as mudanças observadas à administração do estudo do medicamento. Entretanto, teremos diversos argumentos em favor do efeito anti-inflamatório do ch5D12. Primeiro, a diminuição observada em pacientes entre CDEIS em dois grupos maiores de dosagem que suportam a eficácia do tratamento. Secundariamente,

os resultados das análises histológicas e imuno-histoquímicas feitas em biópsias, mostram que ch5Dl2 reduz a atividade inflamatória no cólon ou íleo. No grupo inferior de dosagem nenhum efeito claro foi observado. Os pacientes no grupo 10,0 mg/kg tem a menor contagem da atividade histológica no dia 0 e a redução na contagem da atividade é portanto limitada neste grupo. As maiores contagens em linhagem de base foram observadas nos grupos 1,0 mg/kg e 3,0 mg/kg e nestes pacientes, existe uma redução clara na contagem histológica no dia 28.

Embora dois pacientes foram identificados tendo anticorpos anti-ch5Dl2 no estudo corrente, os níveis de anticorpos HACA permanecem muito baixo e foram apenas detectados em diluições muito baixo do soro. Este permanece a ser estabelecido se as respostas anti-ch5Dl2 serão detectadas nos estudos subseqüentes.

Estes testes representam a primeira administração do anti-CD40 Mab no geral e de ch5D 12 em particular aos humanos. Entretanto, a evidência da atividade biológica de Mab 5D12 tem sido previamente obtidas in vivo no modelo experimental autoimune de encefalomielite (EAE) em macacos sagüi. A administração de partida 5D12 de 2 a 4 semanas depois da indução da doença tem claros efeitos benéficos²³. Este prova in vivo de humanização recombinante iniciada de conceito e ainda desenvolvimento de 5D12. A atividade biológica do ch5Dl2 foi também avaliada no modelo EAE de sagüi. No dia 50 depois da imunização de MOG, a incidência da doença no grupo placebo foi 100% (50% de animais foram mortos por sua gravidade de EAE), enquanto nenhum sinal de doença foi observado no grupo ch5Dl2 tratado²⁴. Além disso o ch5Dl2 tem mostrado atividade funcional em um modelo de transplante renal de macaco reso²⁵ e quando usado como estratégia supressiva imune para evitar respostas imunes contra partículas adenovirais e seus produtos²⁶. Um estudo de reatividade cruzada do tecido em humano e tecidos cinomolgos mostrou que ch5D12 liga-se á superfície da célula B e DC

em órgãos linfóides. Nenhuma reatividade cruzada não esperada foi observada em humanos ou tecidos cinomolgos. Uma avaliação de segurança e tolerabilidade por ch5D12 foi realizada em macacos cinomolgos, em que a administração semanalmente de ch5D 12 por 4 semanas foi mostrado a ser seguro e sem qualquer efeitos colaterais em todos os macacos. Neste estudo, a evidência funcional foi obtida que o ch5D12 pode evitar a ativação da célula B e proliferação²⁷. Coletivamente estes estudos mostraram que o antagonista anti-CD40 humano Mab ch5D12 não tem nenhuma reatividade cruzada não esperada, é seguro, a reatividade imune limitada em macacos cinomolgos, e inibe uma doença inflamatória crônica de protótipo do sistema nervoso central em macacos sagüi. Visto que, a avaliação pré-clínica ainda suportou o desenvolvimento para o uso em pacientes.

A via co-estimulador CD40-CD154 (CD40L) foi validada em modelos de animais como um alvo clínico promissor para o tratamento da doença autoimune e rejeição de transplante.¹⁵ Potencialmente a interação de CD40-CD154 pode ser inibida pelo alvejamento CD40 ou CD154. Todos os estudos prévios tem focado em CD154 antagonizante, que é seletivamente expressado em célula T ativada e plaquetas⁸⁻¹¹. Os estudos clínicos humanos usando um anti-CD154 Mab humano foram parados por causa de eventos tromboembólicos¹²⁻¹⁴. Como este anti-CD154 Mab é construído como um IgG1 humanizado, que ligam-se expressamente bem aos receptores Fc, o anti-CD154 Mab pode reticular CD154 aos receptores Fc resultando na formação de coágulos sanguíneos. Recentemente, o CD40 foi relatado a ser constitutivamente expressado em plaquetas e observado a ser funcionalmente importante usando CD154 solúvel como estímulos pela ativação de plaquetas. Estes efeitos estimuladores que resultados na ativação de plaquetas foram anuladas pela adição de anti-CD154 ou Mabs anti-CD40⁴². Confirmados como características não estimuladoras de ch5D12 também em experimentos com plaquetas humanas, como adição de ch5D12 por plaquetas pré-

estimuladas usando concentração sub-favorável de ADP ou colágeno foi sem qualquer efeito no estado de ativação das plaquetas (M.F. Hoylaerts, observações não publicadas, Leuven, Belgium). Além disso, a parte IgG₄ Fc da cadeia principal ch5D12 Mab tem reduzido a capacidade por ligar aos receptores Fc expressados em plaquetas como comparados com uma cadeia principal IgG₁. A discriminação adicional entre os dois métodos vem do fato que as células B alvos por ch5D12, monócitos, macrófagos e DC, enquanto um anti-CD154 Mab alveja principalmente a célula T ativada, resultando nas estratégias clínicas diferentes marcadamente. Nenhuma indicação de tromboembolismo em qualquer dos pacientes tratados neste estudo foram observados.

O efeito de ch5D12 é amplamente baseado na interferência com ativação celular mediada por CD40. O disparador CD40 induz a citocina e a secreção de quimiocina por macrófagos e DC, e intensifica a capacidade apresentada pelo antígeno posteriormente. Como o ch5D12 antagonizam o receptor CD40 através que a produção TNF- α é induzida³⁹, esta força também antagoniza a secreção TNF- α que incontestavelmente é uma citocina importante na doença de Crohn⁴³. Entretanto, também um número de outras citocinas inflamatórias, tal como IL-8 e IL-12³⁹, são induzida pelo disparo de CD40 e portanto a força ch5D12 tem propriedades anti-inflamatórias em adição á prevenção da produção TNF- α . Se os efeitos observados dependerem principalmente de uma ativação da célula T reduzida, ou de uma liberação reduzida de citocinas e quimiocinas, espera-se investigação adicional.

Este primeiro estudo em homem com ch5D12 mostram os benefícios clínicos promissores na ausência de sérios efeitos colaterais. Os estudos clínicos adicionais serão necessários para estabelecer o papel e ótimo esquema de dosagem por ch5D12 em manutenção de remissões e na segurança de monitoramento de múltiplas infusões. Obviamente, o benefício terapêutico pelo CD40 antagonizante será limitado à doença de Crohn e pode

ser potencialmente estendido por um outro qualquer distúrbio inflamatório.

Exemplo 2

Material e Métodos

Geração de versão quimérica de 5D12

5 A partida da célula 5D12 da linhagem de hibridoma as regiões variáveis de murino de 5D12 foram clonadas. Resumidamente, a partir das células lisadas usando RNA de Qiagen total que foi isolado. Pelo RT-PCR usando os oligos 5' CAG GTS MAR CTS SAG SAG TC W GG 3' e 5' GCA TGT ACT AGT AAT TTT TVT TGT CCA CYT TGG TGC T 3' para
10 ampliar a região VH e usando os oligos 5' CGA TAC GAS MTY CAG CTG ACC CAG TCT CCA 3' e 5'GAC TCA TCT AGA TAC ACT CAT TCC TGT TGA AGC TCT TG 3' para ampliar a região VL de mu5D12. Depois da análise de seqüência as seqüências de consenso para as regiões V foram determinadas. Subseqüentemente as regiões V foram reclonadas em
15 pcDNA3002 (Marissen et al, J. of Virol, 2005: 79:4672-4678), junto com as seqüências genômicas que codificam o IgG₄ humano e capa humano para construir um plasmídeo de expressão de imunoglobulina IgG₄ quimérico.

Geração da versão desimunizada de 5D12

20 Em colaboração com Biovation usando sua tecnologia de imunização proprietária dentro das regiões V, os epítomos de célula T potencial foram identificados. Os epítomos auxiliares de célula T compreendem a seqüência curta de aminoácidos dentro das proteínas A com a capacidade por ligar-se às moléculas de classe II MHC. Pela remoção dos epítomos da células T nenhum anticorpo pode mais longe disparar a ajuda da
25 célula T e a imunogenicidade subsequente contra este. A identificação foi feita usando o filamento de peptídeo. O método de filamento de peptídeo é um método com base em computador para predizer a ligação de peptídeos (seqüência pequena de aminoácidos) 18 moléculas diferentes humanas de classe II MHC com base nas estruturas conhecidas resolvido pela

cristalografia de raio X. Além disso uma análise foi feita para buscar as regiões V por uma presença de peptídeos de ligação da célula T humana conhecida a partir de um banco de dados (www.wehil.wehi.edu.au).

Com base na sequência região V de murino primário de aminoácidos, das regiões V de superfície humanizada (embutidos) foram projetados. Dentro estes 8 epítomos de célula T da sequência VH embutida potencial e dentro das 4 regiões VL embutidas de epítomos de célula T foram identificados. Os epítomos de célula T identificados foram removidos pela substituição de aminoácido. Com base nesta análise as sequências de DNA que codificam o VH desimunizado e região VL foram sintetizados e reclonados no plasmídeo da expressão capa pcDNA3002-hIgG₄.

Mutagênese direta ao local

Para restaurar as sequências de murino dentro da região VH de plasmídeo de expressão pcDNA3002 desimunizado a mutagênese de QuickChange direta ao equipamento do local de Stratagem que foi usado de acordo com o protocolo do fabricante. Na Tabela 4 os oligonucleotídeos usados são mostrados. Resumidamente, o plasmídeo foi desnaturado seguido pelo fortalecimento dos iniciadores sentido e anti-sentido contendo a mutação desejada. Circulando-se (30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C; 600 segundos a 68°C) por 16 vezes usando uma máquina PCR de gradiente Biometra T das sequências mutagênicas e foram incorporadas. O plasmídeo de origem não mutado foi digerido usando DpnI, que apenas DNA mediado por cortes. Subseqüentemente a mistura de PCR contendo o plasmídeo mutado foi transformado em células competentes *XL1-Blue*. As colônias foram selecionadas e analisadas pelas sequências de DNA para o plasmídeo correto. Uma segunda série de experimentos focados em gerar variantes adicionais das posições 29 e 37 especialmente pela substituição de I para V ou L estruturalmente relatado. Em uma maneira similar como descrito acima, os plasmídeos foram gerados usando os oligonucleotídeos como mostrado na

Tabela 6. Duas mutagêneses redondas foram requeridas para criar mutantes duplos (Tabela 7). Os plasmídeos foram usados para transformar as células competentes XL1-blue.

Expressão em PER.C6TM

5 A expressão de várias versões de 5D12 foi feita transitoriamente em PER.C6TM (Crucell). Resumidamente, o dia antes da transfecção PER.C6TM foram tripsinizados e contados. As células foram colocadas em DMEM substituído com 10% de FCS em uma densidade de 4×10^5 células por reservatório em uma placa de 24T reservatórios. Neste meio
10 dia foi recolocado com 0,5 ml do meio fresco. Para cada reservatório 1 µg de DNA de plasmídeo foi diluído em 50 µl de OPTI-MEM I, que foi combinado com volume igual OPTI-MEM I contendo 3 µl de reagente de LipoFectAMINE 2000 (LF2000) (Invitrogen). A mistura foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente para permitir os complexos do reagente
15 DNA-LF2000 formarem-se. Subseqüentemente os complexos do reagente DNA-LF2000 (100 µl) foram diretamente adicionados por cada reservatório. as células transfectadas foram incubadas a 37°C em um incubador de CO₂. Depois de 48 horas os sobrenadantes foram analisados para a expressão do anticorpo.

20 *ELISA*

A quantidade de anticorpo expressado foi medido por um *ELISA sandwich*. Resumidamente, as placas de 96 reservatórios EIA/RIA (Corning 3590) foram revestidas o/n a 4°C com anticorpo anti-IgG humano policlonal (Jackson 109-005-088) diluído com 1/1000 em PBS (100
25 µl/reservatório). Depois de bloquear com PBS contendo 0,05% de Tween e 1% de BSA, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS a 0,05% de Tween. Subseqüentemente como 5D12 quimérico purificado padrão foi aplicado no início da titulação a 400 ng/ml por zero em triplo. As amostras (sobrenadantes transitórios) também aplicados na titulação. Todas as diluições foram feitas

em PBS a 0,05% de Tween. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Depois de lavar 3 vezes 1/5000 diluídos com anticorpo de detecção (fosfatase alcalina de capa anti-humana rotulada (Southern Biotech Associates 2060-04)) que foi aplicada por cada reservatório. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Depois da remoção das placas de incubação foram lavadas 5 vezes. O mancharamento foi feito com o substrato PNP (Sigma N-2765) (1 mg de PNP/ml de tampão de substrato - 100 mM de Tris/HCl, 100 mM de NaCl, 5 mM de MgCl₂.6H₂O pH 9,5 -). O OD₄₀₅ nm foi medido em um BioRad 550 Titertek usando 655 nm como referência.

10 *FACS*

Pela análise FACS a especificidade do antígeno dos anticorpos expressados foram analisadas. As células JY são células B humanas transformadas em EBV, que expressam CD40, Resumidamente, 100.000 células JY foram incubadas com 100 µl sobrenadantes a partir da experiência da expressão transitória a 4°C por 20 minutos. Para as células de anticorpo de grau não ligado foi lavado com PBS contendo 0,05% de NaAzida e 1% de BSA. Como anticorpo secundário 1/100 diluído com IgG anti-humano rotulado por FITC (Jackson 109-095-127) foi usado. Depois de 20 minutos de incubação a 4°C as células foram lavadas. Finalmente as amostras celulares foram medidas em um FACScan (BD).

Resultados

Depois da análise de diversos clones da sequência consensual foi determinado pelas regiões V de murino de 5D12 (Figura 5).

Pela superfície humana das regiões V foram re-projetados, retendo aminoácidos de murino crítico. Pelo filamento de método de peptídeo e a busca do banco de dados de epítomos da célula T potencial dentro destas sequências re-projetadas que foram determinadas. Dentro da região 8 VH (primeira base do epítopo potencial: posição 27, 30, 43, 46, 57, 61, 77 e 83) e dentro da região 4 VL (posição 7, 13, 28 e 86) os epítomos potenciais foram

identificados. Com base no mapeamento dos epítomos da célula T e o processo embutido das ótimas seqüência de aminoácidos VH e VL desimunizados foram definidos (Figura 6). Para remover o epítopo da célula T na posição 61 na atenção da região VH especial não foi retirado por introduzir um local de glicosilação de N potencial (N-X-T/S): NSA foi substituído com STS. Nestas 12 posições do projeto final na região VH foram mudados (posição de contagem 60 a 62 como 1 mudança). Para as posições 8 da região VL foram mudadas.

A partir dos experimentos preliminares comparando os níveis da expressão de 5D12 desimunizados totalmente (DI5D12) comparados ao ch5D12 (renomeado PG100) foi observado que devido as mutações introduzidas DI5D12 foram expressadas em níveis inferiores como comparados às seqüência de origem (dados não mostrados).

Em cada substituição principal pode influenciar como características do anticorpo expressado. Portanto para investigar a influência de cada posição mudada na região VH em como as características do anticorpo as 12 variantes adicionais foram projetadas (Figura 7). Em cada variante na posição 1 foi mudado novamente à seqüência de aminoácido de murino original.

Para testar os níveis de expressão e a funcionalidade de várias versões 14 dos plasmídeos de expressão pcDNA3002 foram construídos. Cada plasmídeo contém uma cadeia principal de IgG₄ humano para que as regiões VH sejam ligadas e a região de capa humano aquelas regiões VL que foram ligadas. Um plasmídeo codificado por ch5D12, em que as regiões V de murino foram usados. Os outros 13 plasmídeos são de versões desimunizadas, em que a região VL desimunizada é usada em combinação com a região VH desimunizada ou um das 12 variantes VH mostradas na Figura 7. Subseqüentemente as células PER.C6TM foram transfectadas com os 14 plasmídeos usando LipoFectamina2000. Também foram incluídos

transfecções de imitação negativas (nenhum plasmídeo). Depois de 48 horas os sobrenadantes transitórios de cada transfecção foram coletados e analisados para a expressão do anticorpo. Na Figura 8 os dados de FACS são mostrados. Claramente todas as construções testadas ligam-se as células JY, indicando que a Especificidade de ligação CD40 de 5D12 é conservada.

Além disso os dados de FACS indicam que os níveis de anticorpo produzido são diferentes. Claramente existe uma diferença no nível de expressão entre DI5D12 e ch5D12 (PG100). As variantes Q5E, K13A, E16Q, T17S, STS6ONSA e T68S mostram as características da mesma expressão como DI5D12. As outras variantes parecem para aumentar os níveis de expressão. Para determinar exatamente os vários níveis de expressão, todos os sobrenadantes foram analisados pelos níveis de anticorpo de medição por ELISA quantitativa. Como mostrado na Tabela 5, as variantes testadas podem ser divididas em 3 grupos: nenhuma ou baixa melhora no nível de expressão (Q5E, K13A, E16Q, T17S e STS6ONSA), as variantes P45L, M48L, S79F e T108S restauram os níveis de expressão como comparadas com ch5D12 (PG100) até 40%, enquanto as variantes I29L e I37V restauram o nível acima de 50%. Especialmente a substituição na posição 29 (I a L) parece ter uma grande influência nos níveis de expressão. A variante I29L foi subsequenteiramente renomeada anticorpo PG102.

A observação que a substituição na posição 29 (I a L) e 37 (I a V) ambos tem grandes influências nos níveis de expressão que foi entre outros aminoácidos por sua vez não esperados I, L e V e são fechados estruturalmente relatados e as 3 formas junto ao grupo dos aminoácidos de cadeia ramificada. Em um estudo subsequente este ainda foi estabelecido pelo qual o efeito das substituições combinadas dos aminoácidos I nas posições 29 e 37 com aminoácidos V ou L relatados estruturalmente são.

A Figura 9 mostra que as variantes V-L-I que foram projetadas no alinhamento com ch5D12 (PG100), DI5D12 e PG102 (variante I29L).

Para testar os níveis de expressão e a funcionalidade destas variantes V-L-I, os plasmídeos adicionais de expressão pcDNA3002 foram construídos que contém uma cadeia principal de IgG4 humano pelo qual a região VH de uma das variantes foi ligada e a região de capa humana daquelas regiões VL foram ligadas, como descrito acima. Subseqüentemente as células PER.C6TM foram transfectadas com o plasmídeos usando LipoFectamina2000. Depois de 48 horas os sobrenadantes transitórios de cada transfecção foram coletados e analisados para a expressão do anticorpo. Para determinar exatamente os vários níveis de expressão, todos os sobrenadantes foram analisados pelos níveis de anticorpo de medição por ELISA quantitativa. Como mostrado na Tabela 8, as várias combinações de um V, L ou I em posições 29 e 37 são associados com níveis de produção variável. Este ainda demonstra que não é justo que todas as substituições V, L e I ultimamente conduziram maiores níveis de produção.

Discussão

Pela redução da imunogenicidade de um anticorpo terapêutico como característica que pode mudar. Neste estudo é mostrado que o resultado do projeto de desimunização em um anticorpo que ainda tem a capacidade de ligação por este antígeno, entretanto o anticorpo deve ser apenas produzido em níveis baixos. Mais provavelmente na expressão existe um problema na reunião das regiões VH e VL desimunizadas. Pela mudança de cada posição substituída novamente à seqüência de murino original dentro da região VH, este foi revelado que algumas posições foram essenciais para um anticorpo de expressão próprio. Especialmente os locais que foram baseados no método de filamento de peptídeo tem uma grande influência no nível de expressão. As mudanças no terminal N, todos os introduzidos com base na pequena influência que tem embutida. Notavelmente, a substituição de I por L na posição 29 tem uma grande influência, que não foi esperada como ambos os aminoácidos que são fechados estruturalmente relatados. A variante 129L foi

subseqüentemente renomeada de anticorpo PG102.

Os estudos subseqüentes demonstraram que as várias combinações de um V, L ou I nas posições 29 e 37 levam as variações nos níveis de produção, demonstrando que embora os 3 aminoácidos de cadeia ramificada V, L e I estão fechadas relacionadas estruturalmente, a substituição de cada uma destas posições 29 e 37 tem um impacto nos níveis de produção dos anticorpos completos.

Exemplo 3

Materiais e Métodos

10 *A construção, seleção e desenvolvimento de uma linhagem celular GS-CHO para a produção de PG102 (variante I29L).*

Lonza Biologics (Lonza) foi requerido por PanGenetics BV por entender a construção, seleção e avaliação de uma linhagem celular GS-CHO que expressa o IgG₄ recombinante humano/PG102 de anticorpo de capa
15 (variante I29L).

As linhagem celulares foram construídas pela transferência de células hospedeiras CHOK1SV com os vetores gerados usando um sistema de expressão do gene de glutamina sintetase de Lonza (GS) (W02003054172). As seqüências do gene foram fornecidos por PanGenetics. A linhagem celular
20 CHOK1SV é variante de suspensão da linhagem celular CHOK1 de ovário de hamster chinês (CHO), que foi adaptado quimicamente definido, ao meio do componente livre do animal (CDACF) (Bebbington et al (1192) Biotechnology 10:169-75; de la Cruz Edmonds MC et al (2006) Mol. Biotechnol. 34:179-90).

25 Todos os reagentes, componentes médios e materiais foram obtidos dos fornecedores acreditados. A formulação de alimentação SF40 e SF41, o meio CM42, e o meio do suplemento SPE foram obtidos por Lonza. O meio CDCHO (Invitrogen) também foi usado com a adição de agente seletivo de Sulfoximina de L-metionina (MSX) pela sub-cultura de rotina de

CDACF adaptado as linhagens celulares e com Fenol vermelho para a transfecção. O agente seletivo MSX foi fornecido por Sigma. Este meio e alimentação não contém antibióticos.

5 A construção do vetor de expressão GS que codifica os genes para o PG102 foi também realizado em Lonza. As células hospedeiras CHOK1SV foram obtidas de um frasco de um banco de células de trabalho crioconservadas de Lonza 269-W.

Cultura celular, concentração e viabilidade

10 As células foram revividas a partir dos frascos de armazenagem crioconservados pelo rápido aquecimento a 37°C e diluindo em aproximadamente 50 mL de meio desenvolvido. As crioprotegidas foram removidas pela centrifugação das células, descartando os sobrenadantes e recolocando em suspensão as células em meio desenvolvido fresco. Para a cultura estática, as células foram desenvolvidas em frasco de T25s com um
15 volume de cultura de 5 a 15 mL. Estas culturas estáticas foram colocadas em uma incubadora a 35,5 a 37,0°C contendo uma atmosfera de 10% v/v de CO₂ no ar.

Para a cultura de suspensão, as culturas foram expandidas em um volume de meio desenvolvido adequado e sub-cultivadas a cada 4 dias
20 para desenvolver em meio CDACF. Os recipientes usados foram: 125 mL de frascos de agitação (para um volume de cultura de 10 a 30 mL), 250 mL de frascos de agitação (para um volume de cultura de 30 a 50 mL), 500 mL de frascos de agitação (para um volume de cultura de 50 a 100 mL), 1 L de garrafas cilíndricas (para um volume de cultura de 100 a 200 mL), ou 2 L de
25 garrafas cilíndricas (para um volume de cultura de 200 a 400 mL). O ponto *headsp* de cada cultura foi gaseificado com 5% de v/v de CO₂ no ar e os frascos selados. As culturas foram então incubadas a 35,5 a 37,0°C em um roteador de plataforma de agitação a 140 ± 5 rpm.

As concentrações celulares totais e viáveis foram obtidas pela

remoção asséptica de uma amostra de cultura, manchando as células não viáveis com Trypan Blue e exame microscópico usando um hemocítmetro Fuchs-Rosenthal modificado. Quando apropriado, as amostras são diluído antes da contagem.

- 5 Alternativamente, as concentrações celulares totais e viáveis foram determinadas usando um contador de partículas CASY-1 ou um Contador celular automatizado Vi-CELL XR. Para o contador CASY-1, uma amostra de cultura foi asepticamente removida de cada frasco, diluído com tampão de Casyton e o número de células totais e viáveis determinadas. As
- 10 células totais e não viáveis foram separadas por tamanho. A porcentagem da viabilidade foi calculada como a razão das células viáveis por células totais multiplicadas por 100. Para o Contador Vi-CELL XR, 0,7 mL da cultura celular ser asepticamente removida e uma contagem Trypan Blue automatizada ser realizada. Uma série de imagens de câmera e um algoritmo
- 15 de análise de computador são usados para identificar e contar as células totais e não viáveis. Para todos os métodos de contagem, porcentagem, viabilidade foram calculados como a razão das células viáveis por células totais multiplicadas por 100.

Transfecção de células hospedeiras CHOK1SV

- 20 No dia da transfecção, o desenvolvimento celular em meio não seletivo foi coletado pela centrifugação e recolocado em suspensão em uma concentração de $1,43 \times 10^7$ células viáveis/mL. Para cada transfecção, aproximadamente 0,7 mL da suspensão celular e de 40 µg de DNA de plasmídeo foi adicionado por um cadinho de eletroporação. O cadinho de
- 25 eletroporação foi então colocado no aparelho de eletroporação e em uma vibração simples de 300 V, 900 µF foi liberado. A seguinte eletroporação, as células a partir do cadinho foram distribuídas em placas de 96 reservatórios em aproximadamente 5000 células hospedeiras/reservatório, usando o meio CD-CHO/fenol vermelho. As placas foram incubadas a 35,5 a 37,0°C em uma

atmosfera de 10% de v/v de CO₂ no ar. O dia depois a transfecção, 150 µL do meio seletivo de CD-CHO/fenol vermelho/66,6 µM de MSX, foi adicionado por cada reservatório. A concentração final de MSX em cada reservatório foi de 50 µM. As placas foram monitoradas para determinar quando as células mortas não transfectadas conduzem o foco das células transfectadas. O foco das células transfectadas tornar-se aparente aproximadamente 3 a 4 semanas depois da transfecção. Todos os transfectantes examinados e processados ainda vêm de reservatórios contendo apenas uma colônia simples, como determinado pela avaliação visual.

10 *Avaliação da produtividade das linhagens celulares em cultura estática*

As placas de 96 reservatórios foram incubadas por aproximadamente 3 a 4 semanas, seguindo pela transfecção para permitir a formação de colônia. As colônias foram examinadas microscopicamente para verificar que estas foram de um tamanho adequado (cobertura maior do que 60% da parte funda do reservatório), e que apenas uma colônia está presente em cada reservatório. Os sobrenadantes de cultura foram então submetidos a ensaio para a produção de anticorpos ensaio ELISA de Lonza para o anticorpo agrupado, descrito sob "ELISA de agrupamento". A confluência da porcentagem do reservatório foi avaliada no período de amostragem. O valor obtido pela divisão do resultado do ensaio pela confluência da porcentagem foi usado para classificar as linhagens celulares.

25 As culturas de alta classificação das linhagens celulares foram expandidas em placas de 24 reservatórios no meio CD-CHO/fenol vermelho/25 µM de MSX e foram deixadas atingir a confluência. Atingindo-se a confluência, esta cultura foi usada para inocular um frasco de T25 no meio CD-CHO/fenol vermelho/25 µM de MSX, enquanto a cultura remanescente foi realimentada com CD-CHO fresco/fenol vermelho/25 µM de MSX, e incubadas por uns 14 dias adicionais. Neste ponto, os sobrenadantes de cultura foram coletados a partir de placas de 24

reservatórios e a concentração de anticorpo foi medido no ensaio ELISA de Lonza para o anticorpo agrupado. Uma seleção das linhagens celulares mais produtivas foram feitas. Atingindo-se a confluência nos frascos de T25, as linhagens celulares selecionadas foram deixadas pela multi-camada e então

5 realimentadas com CD-CHO/25 μ M de MSX. Depois da alimentação, as culturas foram retornadas à incubadora por 4 a 7 dias adicionais até o meio voltar a laranja/amarelo novamente e as células levantar-se dos frascos.

Expansão das linhagens celulares pela cultura de suspensão CDACF

As culturas de suspensão foram iniciadas do frasco confluyente

10 de culturas T25. As culturas de suspensão foram inoculadas em uma concentração de 0,05 a 0,2 x 10⁶ células viáveis/mL em 125 mL de frascos de agitação contendo CD-CHO/25 μ M de meio MSX. Se a concentração da célula viável não reage a 0,05 x 10⁶ de células viáveis/mL depois de um máximo de 14 dias nos frascos de T25, 15 mL de cada cultura foi

15 automaticamente progredida em 15 mL de CD-CHO/25 μ M de MSX em 125 mL de frascos de agitação. As linhagens celulares foram então seriamente sub-cultivadas em CD-CHO fresco/25 μ M de meio MSX, em uma concentração de inoculação de 0,2 x 10⁶ de células viáveis/mL, em um 4 dia de regime de subcultura, até as características desenvolvidas reprodutivas

20 aceitáveis sejam obtidas.

Avaliação do desenvolvimento e produtividade das linhagens celulares na cultura de suspensão

Cultura do frasco de agitação por batelada de alimentação

As culturas de singletos de cada uma linhagem celular

25 selecionada foi preparada em 500 mL de frascos de agitação com 100 mL da suspensão celular usando CM42/4 x meio SPE. As culturas foram inoculadas a 0,2 x 10⁶ de células viáveis/mL e um espaço superior de cada cultura foi equilibrada com 5% de v/v de CO₂ no ar. As culturas foram incubadas a 35,5 a 37,0°C em um roteador de plataforma de agitação a 140 \pm 5 rpm até a

concentração da célula viável, pós-pico, foi menos do que ou igual a $0,6 \times 10^6$ de células viáveis/mL ou dia 15 foi atingido (enormes). Neste ponto as culturas foram coletadas. A concentração celular foi determinada diariamente usando um contador de célula automatizado Vi-CELL. Em uma concentração celular de $1,4$ a $2,2 \times 10^6$ de células viáveis/mL, um bolo de adição do alimento do nutriente SF40 foi feito. Ainda as adições em bolo foram feitas em aproximadamente 24, 48 e 72 horas depois da adição inicial. Uma segunda alimentação (SF41) foi aplicada uma vez que as concentrações celulares estão maiores do que $4,0 \times 10^6$ de células viáveis/mL que foram obtidas. As amostras das culturas foram retiradas em intervalos apropriados, centrifugadas e os sobrenadantes armazenados a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ até serem submetidos a ensaio pela concentração de anticorpo por uma proteína A por HPLC. Os sobrenadantes coletados de cada uma enorme cultura foram armazenados a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$. Em dez culturas enormes com as concentrações de maior anticorpo ainda foram avaliados pela qualidade do anticorpo produzido. As amostras foram avaliadas por níveis agregados usando o método de cromatografia líquida de desempenho de alta permeação em gel (GP-HPLC) antes da proteína A de purificação e caracterização de anticorpo por eletroforese em gel de poli acrimalamida dodecilssulfato de sódio reduzido e não reduzido (SDSPAGE) e análise do foco isoeletrico (IEF) e período de ionização dessorção em laser assistido na matriz de análise de oligossacarídeo da espectrometria de massa de voo (MALDI TOF-MS).

Crioconservação

As células foram crioconservadas em pontos chave em toda parte do programa de trabalho. As células em culturas de desenvolvimento foram recuperadas pela centrifugação e recolocadas em suspensão em uma mistura de crioconservação. Este consistiu do meio de desenvolvimento apropriado (92,5% de v/v) e dimetilsulfóxido (7,5% de v/v).

As alíquotas das células foram então distribuídas em frascos

rotulados, cada alíquota contendo aproximadamente 1,5 mL de meio de crioconservação e aproximadamente $0,5$ a $1,5 \times 10^7$ de células viáveis. Os frascos foram então congelados em um máquina de congelamento de célula programável automática e subsequente transferida aos refrigeradores de nitrogênio líquido.

Número de geração

Para cada uma das linhagens celulares selecionadas, o número de geração das células foi definido como zero no ponto da cultura e foi passado em suspensão. O número de geração foi subsequente calculado em cada sub-cultura usando um procedimento derivado da seguinte equação (curvado abaixo para a 0,5 geração mais próxima).

$$N_f = N_i + \left\{ \frac{1}{\ln 2} \cdot \ln \frac{X_f}{X_i} \right\}$$

Onde: N_f = Número de geração no período f

N_i = Número de geração no período i

X_f = Concentração celular viável (células/mL) no período f

X_i = Concentração celular viável (células/mL) no período i

e $f > i$

Análise dos dados

O tempo integral da área sob a curva desenvolvida (o tempo integral da concentração da célula viável (IVC); 10^9 células.h/L) foi calculado pela soma da área (aproximado a um trapézio de ângulo direito) entre os valores da concentração celular adjacente. As áreas foram calculadas pela multiplicação do meio de duas concentrações de célula viável (células/mL) pelo período de lapso entre as duas determinações (h). Este método é baseado no que é descrito por Renard et al. (1988) em *Biotechnology Letters* 10 (2) páginas 91 a 96.

Onde apropriado em toda parte da taxa de produção específica (q_p em toda parte: mg/ 10^9 células/h) foi calculada pela análise de regressão linear da concentração de anticorpo (mg/L) contra o tempo integral da

concentração celular viável. O declive desta linhagem é igual ao q_p em toda parte. A taxa de produção específica coletada (q_p coletada) foi calculada pela divisão da concentração de anticorpo coletado pelo valor do IVC na coleta.

ELISA de agrupamento

- 5 A concentração de anticorpo de amostras de sobrenadantes foi determinado usando um ELISA que mede o IgG humano agrupado. Esta captura envolve o anticorpo agrupado em amostras e padrão em placas de 96 reservatórios revestidos com IgG Fc anti-humano de cabra. O anticorpo de ligação foi revelado com cadeia leve anti-humana de cabra ligada a
- 10 peroxidase de rábano silvestre e a tetrametilbenzidina de substrato cromogênico. A cor desenvolvida foi proporcional à massa de anticorpo presente na amostra. A concentração foi determinada usando uma curva padrão gerada usando um IgG padrão (Número do lote L07387/5/2)

HPLC da proteína A

- 15 A concentração do produto foi quantificada pela Cromatografia líquida de alto desempenho da proteína A (HPLC) em um Agilent 1100 HPLC. O anticorpo foi seletivamente ligado a uma coluna de imunodeteção da proteína A POROS. O material não ligado foi eluído a partir da coluna e o remanescente do anticorpo de ligação foi liberado pela
- 20 diminuição do pH do solvente. A eluição foi monitorada pela absorbância a 280 nm usando um detector múltiplo de microondas. O anticorpo foi quantificado (usando software Chemstation) contra um anticorpo padrão (Lote L07385/4/10) e corrigido por um coeficiente de extinção de $E^{0,1\%} = 1,52$.

Purificação de afinidade da proteína A

- 25 A alimentação da gravidade rmp das colunas Sepharose da proteína A (5 mL) foram preparadas. As colunas foram limpas antes do uso com 6 M de guanidina HCl e equilibrada com 50 mM de glicina/glicinato de 250 mM de tampão de NaCl, pH 8,0. O pH do material de carregamento da coluna foi ajustado ao pH $8,0 \pm 0,1$ antes da aplicação na coluna. A coluna

por afinidade da proteína A rmp foi lavada com tampão de equilíbrio e eluído com 0,1 M de tampão de glicina, pH 3,5. As colunas eluídas foram neutralizadas por aproximadamente pH 7,0 com 2 M de base de Tris e submetidas à diálise contra solução salina tamponada de fosfato de Dulbecco na preparação pelas análises IEF e SDS PAGE.

Análises SDS PAGE de um anticorpo purificado pela afinidade da proteína A

A cultura das amostras celulares foram preparadas pela análise por uma proteína A de purificação. A eletroforese foi realizada usando de 4 a 20% de géis de poliacrilamida Novex pré-moldados. Para reduzir SDS PAGE, as amostras foram reduzidas usando 2-mercaptoetanol e desnaturada por SDS ao pH 8,0. As amostras foram aquecidas por $2,0 \pm 0,5$ minutos antes destes serem carregadas no gel (10 μ g por rota). O SDS PAGE não reduzido foi realizado usando os mesmos géis e tampão de amostra de não redução de Novex (2- mercaptoetanol não é adicionado). As amostras foram aquecidas por um período padrão de 1,0 a 0,5 minutos antes destas serem carregadas em gel (4 μ g por rota). Seguindo a eletroforese, as proteínas foram visualizadas pelo manchamento por 75 minutos com Coomassie brilliant blue R250 e desmanchadas com metanol/ácido acético.

Análise IEF de um anticorpo purificado pela afinidade da proteína A

A cultura das amostras celulares foram preparadas pela análise por uma proteína A de purificação. A análise IEF foi realizada usando géis IEF de agarose pré-moldados, do pH 3 ao pH 10. Aproximadamente 10 μ g da amostra de proteína A por rota foi carregada em gel e então pré-focada por 70 Vh. Depois da remoção das faixas de aplicação das amostras, a eletroforese foi continuada por 1500 Vh (1500 V, 20 mA, 25 W por gel). Os géis IEF foram fixados em um ácido tricloacético: ácido sulfossalisílico: solução de metanol e então manchados com Coomassie Brilliant Blue R250 (Números dos lotes de Coomassie Blue 003/L11905/118 e 003/L11905/131). Os géis foram então desmanchados e secados. (Números dos lotes de 003/L11905/117

e 003/L11905/121 desmanchados).

GP-HPLC

O métodos GP-HPLC separa os componentes da proteína A de acordo com seu tamanho. Grandes componentes, tal como agregadores de proteína A, também são grandes para penetrar nas partículas da matriz por qualquer maior extensão e portanto eluídos a partir da coluna adiante dos menores componentes, tal como monômero de proteína A. Os menores componentes, tal como fragmentos, penetram na matriz mais facilmente e eluem depois o monômero. Esta técnica foi portanto usada para separar o monômero de anticorpo tantos dos agregados quanto dos fragmentos. O componente monomérico foi identificado por este período de retenção característica e posição, relativo aos marcadores de calibração.

As amostras não diluídas, foram injetadas para dar 50 a 250 µg carregadas onde a concentração do produto foi de 1 a 5 mg/mL (faixa de carregamento validado do ensaio de Lonza). A faixa da massa molecular para a coluna GF-250 foi de 4 a 400 kDa.

Os componentes de amostra foram detectados a 280 nm e cromatogramas de pico foram analisados usando software Agilent Chemstation. A integração foi realizada usando o método de gota perpendicular para agregados e espuma tangente para os fragmentos.

A proporção dos componentes de amostra foi determinado pelo cálculo das áreas de pico de cada componente relativo à área de pico integrada total.

Análise de MALDI TOF-MS

A análise de oligossacarídeos do anticorpo PG102 produzido em cada linhagem celular foi realizada por MALDI TOF-MS usando uma MicromassaTM MALDI-LR ligada a extração atrasada. O MALDI TOF-MS foi operado na configuração que reflete o modo de íon positivo. O instrumento foi calibrado usando um padrão de N-glicano misturado.

O anticorpo foi purificado a partir dos sobrenadantes coletados usando uma coluna da proteína A POROS. As frações purificadas foram coletadas e as ligações de bissulfeto foram reduzidas com ditioneitol seguido pela alquilação dos tióis reduzidos usando iodoacetato. Os oligossacarídeos foram liberados usando a enzima N-glicanase (PNGaseF) e foram colocados entre duas camadas da matriz de ácido benzóico de super-diidróxi (super-DHB) na placa alvo pela análise MALDI TOF-MS.

Resultados

Transfecção de células hospedeiras CHOK1SV

10 A sequência do gene PG102 foi usado por Lonza para construção do vetor de gene duplo pPG102/DGV (não mostrado) que foi usado para transfectar a linhagem celular hospedeira CHOK1SV pela eletroporação. Seis séries de transfecções foram realizadas usando o vetor pPG102/DGV e sobrenadantes de 255 transfectantes que foram avaliados para a produção de anticorpos em placas de 96 reservatórios por ELISA de agrupamento. Os níveis de anticorpos detectados foram produzidos por 99,6% dos transfectantes avaliados. A classificação de quarenta e três transfectantes foram selecionados pela avaliação adicional em placas de 24 reservatórios.

Expansão de culturas estáticas e adaptação da suspensão

20 As culturas das linhagens celulares GS-CHO selecionadas foram primeira expandidas em placas de 24 reservatórios e então expandidas em frascos T25 estáticos. As células remanescentes nas placas de 24 reservatórios foram alimentadas com meio fresco e 'enormes' antes da avaliação da produtividade do anticorpo. As linhagens celulares selecionadas apresentaram uma faixa de concentrações de anticorpo de 8,3 a 120 mg/L (Figura 10).

25 As culturas das 23 linhagens celulares com as mais altas concentrações do produto, como determinado por ELISA de agrupamento, foram selecionadas pela avaliação adicional. As culturas selecionadas foram

progredidas no meio CDACF na cultura de suspensão. Todas as linhagens celulares foram sucessivamente adaptadas a cultura de suspensão e foram selecionadas pela avaliação adicional em culturas de batelada de alimentação.

Avaliação das características de desenvolvimento e produtividade das
 5 *linhagens celulares selecionadas em cultura do frasco de agitação por*
batelada de alimentação.

As características de desenvolvimento e produtividade das 23 linhagens celulares selecionadas foram avaliadas em cultura do frasco de agitação por batelada de alimentação. As culturas de singletos foram
 10 preparadas para cada linhagem celular. Duas alimentações, SF40 e SF41, foram adicionado às culturas quando a concentração da célula viável encontra o critério de alimentação. O protocolo usado para o regime de alimentação imita tão finalmente quanto a possível técnica, o processo de fermentação GS-CHO genérico de Lonza. Os dados do desenvolvimento e produtividade para
 15 as 23 linhagens celulares selecionadas estão presentes na Tabela 9. O HPLC de uma análise de proteína dos sobrenadantes coletados da cultura do frasco de agitação por batelada de alimentação mostrou que quatro linhagens celulares produzem as concentrações de anticorpo de maiores do que 1000 mg/L. A linhagem celular L107 produziu a maior concentração de anticorpo,
 20 1674 mg/L.

A caracterização do anticorpo purificado a partir da cultura do frasco de
agitação por batelada de alimentação das linhagens celulares CHO
selecionadas

As amostras coletadas de dez linhagens celulares com a
 25 concentração mais alta de anticorpo que foram purificadas usando cromatografia Sepharose da proteína A rmp antes da análise. Os anticorpos purificados da proteína A foram então analisados usando SDS PAGE e IEF. A análise visual da proteína A de amostras purificadas analisadas por SDS PAGE sob condições de não redução mostrou que todas as amostras foram

comparadas a cada uma outra, e exibiu um grupo de anticorpo intacto em aproximadamente 200 kDa (dados não mostrados). Os menores grupos adicionais foram visíveis, embora estes não podem ser visível na imagem em gel. Três grupos com massa molecular entre 116 e 200 kDa, um grupo com um peso molecular entre 66 e 97 kDa, um grupo com um peso molecular entre 37 e 55 kDa e dois grupos com pesos moleculares entre 22 e 31 kDa também foram observado. Um grupo extra observado entre 66 e 97 kDa é a metade do anticorpo, típico de anticorpos IgG₄ sob condições de não redução. A mesma metade do anticorpo é também observado no controle de ensaio inter IgG₄ (IAC).

A proteína A de amostras purificadas analisadas por SDS PAGE sob condições de redução também foram comparadas a cada uma outra, exibindo o grupo de cadeia pesada em aproximadamente 50 kDa e o grupo de cadeia leve em aproximadamente 25 kDa (dados não mostrados). A análise IEF mostrou que a integridade da proteína A de amostras de anticorpos purificados a partir das linhagens celulares selecionadas demonstraram perfis comparáveis, com os seis grupos primários (3 grupos maiores e 3 menores) no pI da faixa 8,15 a 9,30 por todas as linhagens celulares exceto L97, M92 e M59. Estas três linhagens celulares exibiram três grupos maiores e dois menores. Os grupos adicionais foram observados nas amostras J3 e J4, embora todos estes não possam ser visíveis na imagem em gel.

Análise de oligossacarídeo do anticorpo

A análise de oligossacarídeo do anticorpo produzido por cada uma das dez linhagens celulares selecionadas pela avaliação adicional na cultura do frasco de agitação por batelada de alimentação foi determinada pelo MALDI TOF-MS. As estruturas de oligossacarídeos predominantes no anticorpo obtido a partir das dez linhagens celulares que são GOF e G1F, e que são típicas estruturas de oligossacarídeos ligados por N observadas nos

anticorpos. Os níveis relativamente baixos das estruturas de oligomanose foram detectadas com o nível mais alto de 6,7% de glicanos totais medidos por anticorpos derivados da linhagem celular L52. As estruturas de 5 oligomanose (5 homens) foram observados em todas as amostras em uma faixa de 1,1 a 4,6% de glicanos totais. Todas as amostras analisadas contendo níveis comparados de oligossacarídeos e concentrações relativamente baixas de 5 homens (dados não mostrados).

GP-HPLC

Quando o anticorpo produzido por cada uma das dez linhagens celulares selecionadas pela avaliação adicional foi analisada por GP-HPLC, os componentes de peso molecular inferior (LMWC) foram os menos críticos mas um nível sob 25% foi preferível. Todos os níveis apresentados de amostra sob 25%, com a exceção de L52, que apresentou um nível de 27,1% (Tabela 10).

Dois cálculos diferentes de proporções dos agregados não seriam usualmente usados, mas foi considerado necessário como os níveis LMWC variados de muitos modos entre as amostras.

A análise adicional dos dados, exclui o LMWC e observa apenas um monômero e grandes picos, demonstrando as áreas de picos agregados de menos do que 2,2% por todas as amostras (Tabela 11). Os níveis sob 5% são considerados aceitáveis.

Seleção das linhagens celulares

Três linhagens celulares foram selecionadas para a preparação de estoques de pré-sementes (PSS). O critério de seleção usado foi uma combinação de alta concentração de anticorpo coletado, características desenvolvidas aceitáveis e características de qualidade dos produtos aceitáveis.

A linhagem celular L107 foi selecionada como a linhagem celular que conduz como exhibe a mais alta concentração de anticorpo coletado

das 23 linhagens celulares avaliadas, junto com as características de qualidade do produto e desenvolvimento aceitável (Figura 11A).

5 A linhagem celular L25 exibiu a segunda mais alta concentração de anticorpo coletado das vinte e três linhagens celulares avaliadas, junto com características de qualidade do produto e desenvolvimento aceitável (Figura 11B). Portanto a linhagem celular L25 foi selecionada novamente como a primeira linhagem celular.

10 A linhagem celular M95 exibiu a terceira mais alta concentração de anticorpo coletado das vinte e três linhagens celulares avaliadas, e tem as características de qualidade do produto e desenvolvimento aceitável (Figura 11C). Nesta linhagem celular de base M95 foi selecionado novamente como o segundo da linhagem celular.

Crioconservação de estoques de pré-sementes

15 Os estoques de pré-sementes (20 frascos por estoque) foram crioconservadas para cada uma das três linhagens celulares selecionadas. Estes estoques foram armazenados em refrigeradores de nitrogênio líquido de fase de vapor. As linhagens celulares L107, L25 e M95 foram renomeadas Del, DC2 e DC3 respectivamente.

Discussão

20 Lonza Biologics foi requerido por entender a construção, seleção e avaliação de uma linhagem celular GS-CHO que expressa o anticorpo de capa IgG₄/PG102 recombinante humano.

25 A sequência do gene foi fornecido por PanGenetics e os vetores foram gerados usando o sistema de expressão do gene de glutamina sintetase de Lonza (GS). A linhagem celular CHOK1SV, variante de suspensão da linhagem celular do ovário do hamster Chinês (CHO) CHO-K1 adaptado quimicamente definido, o componente livre do meio animal, foi transfectado pela eletroporação.

A partir das transfecções CHOK1SV, as 254 linhagens

celulares foram obtidas que secretam o anticorpo. Quarenta e três linhagens celulares foram avaliadas para desenvolvimento e produtividade em placas de 24 reservatórios. As concentrações de anticorpo de até 120 µg/mL foram obtidas.

5 Vinte e três linhagens celulares foram avaliadas em cultura de singleto do frasco de agitação por batelada de alimentação. As concentrações de anticorpo coletadas na faixa de 121 a 1674 µg/mL foram obtidas. As concentrações de anticorpo coletadas em excesso de 1000 mg/L foram atingidas por quatro linhagens celulares. As dez linhagens celulares com a
10 mais alta concentração de anticorpo foi selecionada pela análise qualidade do produto. A qualidade do produto do anticorpo purificado de cada uma das linhagens celulares selecionadas foi comparadas a cada uma outra pela eletroforese em gel poliacrilamida dodecilssulfato de sódio reduzida e não reduzida e análise de foco isoeletrico. A análise de oligossacarídeo do
15 anticorpo purificado de cada uma das dez linhagens celulares selecionadas mostrou baixa relativamente (< 4,6%) nos níveis de 5 oligomanose.

A análise GP-HPLC mostrou que os níveis agregados foram abaixo de 1% para cada uma das três linhagens celulares superiores.

20 As três linhagens celulares (L107, L25 e M95) foram selecionadas pela avaliação adicional com base nos dados de desenvolvimento, produtividade e qualidade do produto. Os estoques de pré-sementes de 20 frascos de cada uma das linhagens celulares foram crioconservadas. As três linhagens celulares foram renomeadas DC1, DC2 e DC3 respectivamente.

25 **Exemplo 4**

Determinação de cinéticos de ch5D12 (PG100) e PG102 (variante I29L) ligando a ressonância de plasmon de superfície pelo Fc de CD40 humano (Biacore)

Materiais e Métodos

Os cinéticos do ch5D12 (PG100) e PG102 (variante I29L)

ligando a CD40 humano foram comparados pela ressonância de *plasmon* de superfície em uma temperatura constante de 25,0°C, usando um instrumento de Biacore 3000. O domínio extracelular de CD40 humano recombinante fundido ao domínio IgG1-Fc humano (huCD40-Fc; R&D Sistema de número de catálogo 149-CD-50) foi usado como o antígeno alvo nestes experimentos. O HuCD40-Fc (1 µg/mL em 10mM de tampão de acetato, pH 5,0) foi ligados por intermédio dos grupos amina de resíduos de Lys por fragmentos CM5 Biacore ativado por carbodiimida, resultando em um nível de imobilização de antígeno de 127,4 RU. Para as análises cinéticas, as séries de diluição de ch5D12 (PG100) e PG102 (faixa 10,0 µg/mL a 0,313 µg/mL) foram preparados em tampão de Running Biacore (Solução salina tamponada por HEPES contendo EDTA e tensoativo; HBS-EP). As análises cinéticas foram realizadas em uma taxa de fluxo de 30 µL/minutos. As amostras foram deixadas ligar-se por 4 minutos e para separar-se por 5 minutos, na mesma taxa de fluxo. A superfície do fragmento foi então regenerado por 30 segundos usando 30mM de NaOH e uma linhagem de base restabelecida em HBS-EP por 2,5 minutos antes da injeção da próxima amostra. As amostras alternadas de PG102 e ch5D12 (PG100) foram injetadas, um aumento na concentração para uma primeira série de cópias em cada diluição e então diminuição pela segunda série de cópias.

O software de controle BIAcore (Versão 3.2) foi usado para a coleção de dados e o software de avaliação BIA (Versão 4.1) foi usado para a análise de dados cinéticos. Os parâmetros de ligação foram calculados usando dois diferentes modelos de interação molecular: um modelo analítico bivalente e modelo de ligação Langmuir 1:1.

Resultados

Os níveis máximos de ligação observados para os anticorpos ch5D12 (PG100) e PG102 foram 152,5 RU e 140,2 RU, respectivamente.

A taxa cinética calculada constante de acordo com os modelos

de ligação bivalente e Langmuir (k_a e k_d , ou k_{a1} e k_{d1} , respectivamente) levemente diferenciados pelos dois anticorpos. Deste modo, PG102 apresentou taxas rápidas de associação e dissociação do que ch5D12 (PG100) (Figura 12), embora em toda parte a afinidade (KD) dos dois anticorpos não diferem apreciavelmente dentro dos modelos. Os parâmetros cinéticos a partir destes experimentos estão resumidamente abaixo:

Modelo Langmuir (1:1):

	ch5D12 (PG100)	PG102
k_a	$1,88 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$2,51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
k_d	$5,07 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$5,96 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
KD	$2,71 \times 10^{-10} \text{ M}$	$2,37 \times 10^{-10} \text{ M}$

Modelo de ligação bivalente (1:2):

	ch5D12 (PG100)	PG102
k_{a1}	$6,41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$7,82 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
k_{d1}	$1,60 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$2,47 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
k_{a2}	$1,21 \times 10^{-3} \text{ RUs}^{-1}$	$1,31 \times 10^{-3} \text{ RUs}^{-1}$
k_{d2}	$2,55 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$2,24 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
KD	$5,29 \times 10^{-9} \text{ M}$	$5,41 \times 10^{-9} \text{ M}$

A análise de Goodness de ajuste para os dois métodos indicam que os dados são melhores descritos pelo modelo de ligação bivalente.

As afinidades calculadas dos duas variantes de anticorpos diferem-se entre os modelos, entretanto, estima-se que a dissociação constante (KD) obtida para cada um anticorpo com o mesmo modelo foi comparável; $2,71 \times 10^{-10} \text{ M}$ e $2,37 \times 10^{-10} \text{ M}$ para ch5D12 (PG100) e PG102 respectivamente usando o modelo Langmuir e $5,25 \times 10^{-9} \text{ M}$ e $5,41 \times 10^{-9} \text{ M}$ usando o modelo analítico bivalente.

Exemplo 5

Inibição da ligação de ch5D12 (PG100) e PG102 por células JY usando um anticorpo anti-idiotipo

Para demonstrar que PG102 (variante I29L) liga-se ao mesmo epítipo de CD40 como esta molécula de origem ch5D12 (PG100), um anticorpo de anti-idiotipo foi usado para inibir a ligação de PG102 ou ch5D12 que expressam as células JY medidos por FACS.

Materiais e Métodos

As células JY que expressam o CD40 humano foram bloqueados com 5% do soro humano por 30 minutos em temperatura ambiente. O anticorpo anti-idiotipo por mAb 5D12 de murino (clone 173-36-1) foi pré-incubado em uma concentração de variação (0 a 10 µg/mL) com ch5D12 (PG100) (1 µg/mL), PG102 (1 µg/mL), ou anticorpo anti-huCD86 quimérico de controle negativo (chFUN-1; 1 µg/mL) em um volume total de 50 µL/tubo e incubado por 15 minutos. As células JY foram lavadas com tampão de FACS (1 x PBS, 1% de BSA e 0,05% de azida de sódio) e os sobrenadantes foram descartados. As células JY foram recolocadas em suspensão em tampão de FACS a uma concentração de 2×10^6 células/mL. 50 µL da suspensão celular JY foi adicionada aos anticorpos pré-incubados misturados para dar um volume final de 100 µL/tubo. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C antes da lavagem com 4 ml de tampão de FACS /tubo e os sobrenadantes foram descartados. O grânulo da célula foi recolocado em suspensão em 100 µL de IgG-FITC anti-humano de cabra diluído (Jackson ImmunoResearch Labs. Cat. N° 109-095-127) em tampão de FACS (1:100) e incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 4 ml de tampão de FACS e os sobrenadantes foram descartados. O grânulo foi recolocado em suspensão em 200 µL de tampão de FACS e o anticorpo de ligação foi medido usando um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson).

Resultados

O anti-idiotipo mAb 173-36-1 que inibiu PG102 e ch5D12 (PG100) ligando ao huCD40 expressado nas células JY em uma maneira dependendo da concentração (Figura 13). A ligação de chFUN-1 por CD86 que também é expressada nas células JY não foi influenciada por mAb 173-36-1. Não existe nenhuma diferença significativa no efeito de bloquear o anti-idiotipo mAb 173-36-1 na ligação de anticorpos específicos por CD40 em

CD40 nas células JY. Por Exemplo, os valores de log calculados IC50 por inibição de ch5D12 mediada por mAb 173-3-1 (PG100) (Batelada 1) e PG102 (Batelada 2) foram $-5,74 \pm 0,14$ e $-5,76 \pm 0,11$, respectivamente ($p > 0,05$; ambos $n = 4$). Estes valores correspondem as concentrações de anti-idiotipo de aproximadamente $1,8 \mu\text{g/mL}$ ($\sim 12 \text{ nM}$). A Tabela 12 mostra um resumo do cálculo valores de $-\log\text{IC}_{50}$ para inibição mediada por anti-idiotipo de ch5D12 (PG100) e PG102 ligando às células JY.

Exemplo 6

Ligação de ch5D12 (PG100) e PG102 por CD-40Fc determinados por ELISA

Material e Métodos

As placas de ELISA (placa Costar EIA/RIA, número do catálogo Corning 3590) foram revestidas com 1004/reservatório huCD40-muIg (Ancell, número do catálogo 504-020), diluído com 250 ng/mL em PBS e incubados durante a noite a 4°C em um ambiente úmido. As placas foram lavadas 3 vezes com $200 \mu\text{L}$ /tampão de lavagem do reservatório (0,05% de Tween-20 em PBS). Subseqüentemente, as placas foram bloqueadas com $200 \mu\text{L}$ /tampão bloqueador de reservatório (5% de fração V BSA [Roche, número do catálogo 735094] em tampão de lavagem) e incubados por 1 hora a 37°C (ambiente úmido). As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Os anticorpos testados (ch5D12 (PG100), PG102, e anticorpo anti-huCD86 quimérico de controle negativo chFUN-1) foram diluídos na faixa de 0 a 1200 ng/mL no tampão bloqueador e transferido para as placas de ensaio em um volume final de $100 \mu\text{L}$ /reservatório, seguido pela incubação por 1 hora a 37°C (ambiente úmido). As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem seguido pela adição de $100 \mu\text{L}$ /de detecção de anticorpo de capa AP anti-humano de cabra por reservatório (Southern Biotech Associates número do catálogo 2060-0) diluído com 1:1000 no tampão bloqueador. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em um ambiente úmido antes de lavar 3 vezes com tampão de lavagem e uma lavagem simples adicional com PBS. O

substrato PNP foi preparado pela adição de tabletes de fosfato de p-nitrofenila de 1 tablete (Sigma, número do catálogo N-2765) em 15 mL de tampão PNP de substrato (12,1 g de Tris, 5,84 g de NaCl, 1,02 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 1L de H_2O (ajustado ao pH 9,6 com HCl). O substrato PNP foi adicionado as placas de ensaio em 100 μL /reservatório. As placas foram incubadas por diversos minutos (máximo 30 minutos) a 37°C para permitir o desenvolvimento da cor antes da reação ser interrompida pela adição de 3 M de NaOH. A intensidade da cor foi determinado em 405 nm usando uma leitor de micro-placa (Biorad, modelo 550).

10 *Resultados*

Em um número de experimentos independentes seriamente diluído com ch5D12 (PG100) e PG102 (Variante I29L) foram observados ligar-se comparavelmente por CD40-Fc imobilizado (Figura 14), enquanto o anticorpo de controle anti-CD86 não apresentou ligando apreciado a CD40-Fc. As concentrações da metade máxima da ligação calculada por todos os experimentos são resumidos na Tabela 13. Nenhuma diferença significativa foi observada na concentração da metade-máxima da ligação por qualquer das bateladas dos anticorpo anti-CD40 avaliado.

Exemplo 7

20 *Ligação de ch5D12 (PG100) e PG102 por huCD40 expressado nas células JY determinados por FAGS*

Materiais e Métodos

CD40 que expressa as células JY foram lavadas com tampão de FACS (1 x PBS, 1% de BSA e 0,05% de azida de sódio). O sobrenadante foi descartado e as células JY foram recolocadas em suspensão em tampão de FACS em uma concentração de 2×10^6 células/mL. Depois disso, 50 μL da suspensão da célula JY foi adicionada ao 5012L de cada um doa anticorpos testados (ch5D12 (PG100), PG102, e chFUN-1 anticorpo antihucD86 quimérico de controle negativo) preparado na faixa de concentração de 0 a

900 ng/mL e incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 4 ml de tampão de FACS/tubo e os sobrenadantes foram descartados. Os grânulos celulares foram recolocados em suspensão em 100 µL de IgG-FITC anti-humano de cabra (Jackson Immunoresearch Labs. número do catálogo 109-095-127) diluído com 1:100 em tampão de FACS e incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com 4 ml de tampão de FACS e os sobrenadantes foram descartados. O grânulo foi recolocado em suspensão em 200 µL de tampão de FACS e o anticorpo de ligação foi medido usando um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson).

10 *Resultados*

Todas as bateladas testadas de ch5D12 (PG100) e PG102 mostrou características similares do ligando de um CD40 expressado nas células JY (Figura 15) com concentrações de ligação de metade-máxima de anticorpo comparáveis (Tabela 14). O chFUN-1 também ligou-se as células JY, embora com o meio de intensidade de fluorescência inferior (MFI) do que ch5D12 (PG100) e PG102. Isto é porque as células JY também expressam CD86 humano.

Discussão

As características de ligação por CD40 de várias bateladas PG102 (Variante I29L) e ch5D12 (PG100) foram determinadas usando ensaios com base de ELISA e ensaio celular in vitro. A ligação de PG102 e ch5D12 (PG100) pelas células JY que expressam CD40 foi inibido com a potência igual pelo mAb 173-36-1 anti-idiotipo. Deste modo, a faixa do meio dos valores calculado $-\log IC_{50}$ por bateladas PG102 e CH5D12 (PG100) foi de 5,51 a 6,11 ($n = 8$), e 5,43 a 6,04 ($n = 10$), respectivamente ($p > 0,05$). O anticorpo 173-36-1 é direto contra as regiões variáveis do ch5D12 (PG100) precursor, mAb 5D12 de murino, e não exibem a ligação de um anticorpo de controle de isotipo anti-CD86. Em experimentos adicionais a concentração da metade máxima da ligação de PG102 e ch5D12 (PG100) foi determinado pela

análise de ELISA do anticorpo ligando ao CD40-Fc humano, e pela análise FACS do ligando às células JY. No ensaio ELISA não existe nenhuma diferença significativa entre a concentração metade-máxima da ligação de PG102 e ch5Dl2 (PG100) por qualquer batelada testada. Por Exemplo, o meio
 5 calculado concentrações de metade-máxima de ligação $-\log$ para as bateladas PG102 e ch5Dl2 (PG100) que foram $7,47 \pm 0,04$ e $7,54 \pm 0,03$, respectivamente ($P > 0,05$, ambos $n = 4$), correspondente por aproximadamente 30 ng/ml. As concentrações da metade-máxima da ligação similar foram observadas em experimentos de FACS PG102 e ch5Dl2
 10 (PG100) ligando ao CD40 expressado nas células JY. Estes resultados indicam que PG102 e ch5Dl2 (PG100) partem do mesmo parátipo de ligação CD40, como demonstrado pelas características de potência comparável do anticorpo de anti-idiotipo para a inibição de PG102 e ch5Dl2 (PG100) ligando ao CD40. Além disso, ambos os anticorpos apresentam potências in vitro
 15 similar pelos ligando ao CD40 humano em ELISA e ensaios com base em células. Juntos, os dados apresentados sugerem que as propriedades de ligação de PG102 e ch5Dl2 (PG100) por CD40 humano são os mesmos.

Exemplo 8

Inibição competitiva de ch5Dl2 (PG100)-PE e PG102-PE ligando às células JY que expressam CD40 humano usando anticorpo anti-CD40 não rotulado
 20

Materiais e Métodos

As células JY (Linhagem celular linfoblastóides humanas B transformadas por vírus Epstein-Barr) foram desenvolvidos em meio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) contendo 10% de soro bovino fetal
 25 inativado por calor (FCS), 2 mM de glutamina L e 50 µg/mL de gentamicina em uma atmosfera umidificada pelo ar contendo 5% de CO₂, a 37°C. As células foram coletadas no dia da medições de citometria de fluxo. Os anticorpos ch5Dl2 (PG100) (Batelada 4) e PG102 (Batelada 2) não rotulados foram usados nestes experimentos. Ambos os anticorpos também foram

usados na forma rotulada de PE pela determinação direta do ligando às células JY pela citometria de fluxo. Os anticorpos foram rotulados por costume com PE pelo AbD Serotec (Oxford, UK). Para cada análise de FACS os seguintes protocolos foram usados. As células JY foram coletadas da cultura celular e contadas. Subseqüentemente 1×10^5 de CD40 que expressa as células JY /200 μL de tampão de incubação (PBS, 1% de BSA, 0,05% azida de sódio) foram incubados com $1 \mu\text{g/mL}$ de anticorpo ch5D12 (PG100) ou anticorpo PG102 rotulados, na presença de concentrações que variam de (0 a $10 \mu\text{g/mL}$) da competição não rotulada de ch5D12 (PG100) ou PG102, por 30 minutos de 4 a 8°C . As células foram lavadas seguido pela análise de citometria de fluxo em que o MFI em cada concentração foi determinado usando uma citometria de fluxo FACScan (Becton & Dickinson). Cinco mil eventos/amostras foram medidas e analisados usando software CellQueste (Becton & Dickinson).

Resultados

O anticorpo ch5D12 (PG100) e PG102 não rotulados apresentou característica inibidoras similares nestes ensaios (Figura 16). Meios de valores de inibição $-\log \text{IC}_{50}$ de $1 \mu\text{g/mL}$ de ligação de ch5D12 (PG100) por ch5D12 (PG100) e PG102 não rotulados foram de $7,50 \pm 0,03$ e $7,63 \pm 0,03$, respectivamente (ambos $n = 4$), enquanto o meio de valores para a inibição de $-\log \text{IC}_{50}$ de $1 \mu\text{g/mL}$ da ligação de PG102 por ch5D12 (PG100) e PG102 não rotulados foram de $7,54 \pm 0,01$ e $7,65 \pm 0,02$, respectivamente (ambos $n = 4$). Estes valores de $-\log \text{IC}_{50}$ correspondem as concentrações PG102 e ch5D12 (PG100) de aproximadamente 20 a 30 ng/mL (isto é ~ 130 a 200 pM).

Exemplo 9

Inibição da liberação de IL-8 a partir das células THP-1

Materiais e Métodos

A funcionalidade de PG102 foi medido usando um ensaio funcional com base celular. Resumidamente, no dia 1, THP-1 e células

humanas Jurkat 39,8/50 foram cultivadas em meio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM, BioWhittaker, número do catálogo BE12-722F suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, ref. 10270-106) e 50 µg/mL de gentamicina (Invitrogen, número do catálogo 15750-045). As células THP-1 foram pulsadas com rhuIFN-γ a 1000 unidades/mL de cultura celular.

No dia 3 do bioensaio as células THP-1 e Jurkat 39,8/50 foram requeridas em uma concentração de 4×10^5 células/mL. As células THP-1 e J39,8/50 foram contadas e sua viabilidade determinadas. As células foram então diluídas em uma concentração de aproximadamente 1×10^6 células/mL. As suspensões celulares foram misturadas 1:1 e incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada por 5% de CO₂ por 48 horas.

No dia 3 as células THP-1 e J39,8/50 foram lavadas como os seguintes (no caso das células THP-1 a etapa de lavagem foi para remover o IFN-γ): 5 mL de IFN-γ pulsado com a suspensão das células THP-1 e J39,8/50 foram transferidas para um tubo falcon de 50 mL. 40 mL de solução salina balanceada por Hank (HBSS) foi adicionada, e as células foram centrifugadas a 1500 rpm (usando centrífuga IEC) por 6 minutos. Os sobrenadantes foram descartados. O grânulo celular foi recolocado em suspensão em pré-aquecimento suplementado por IMDM com 10% de FCS. As células THP-1 e J39,8/50 foram ajustadas a uma concentração de 4×10^5 células/mL.

Para os ensaios de inibição da amostra testada ch5D12 (PG100) ou PG102 (Variante I29L) foi seriamente diluído com meio IMDM aquecido suplementado com 10% de soro bovino fetal para obter uma concentração do ensaio final na faixa de 0 a 160 ng/mL. As THP-1, J39,8/50 e as amostras testadas foram adicionadas para triplicar em um ciclo de placas celulares de culturas da parte inferior (NunclonTM) na seguinte ordem: 50 µL de células THP-1 (equivalente as células 2×10^4 por reservatório), 50 µL da amostra testada e 50 µL de células J39,8/50. O volume total foi de 150 µl por

reservatório. As placas de cultura celular foram embrulhadas em película de aprisionamento porosa e incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada a 5% de CO₂ por 48 horas.

No dia 5, depois de um período de cultura de 48 horas, 70 µL dos sobrenadantes de cultura celular foram aspirados e transferidos por uma placa microtituladora de fundo redondo. Os sobrenadantes de cultura celular foram submetidos à ensaio pelo conteúdo de IL-8 usando um ELISA comercial (Biosource, citosérie IL-8 humano, número do catálogo CHC1304) de acordo com as instruções do fabricante.

Resultados

O PG102 (I291 variante) e ch5D12 (PG100) mostrou efeito inibidor similar em liberação IL-8 evocada pelas células THP-1 (Figura 17). Os valores calculados $-\log IC_{50}$ para os dois anticorpos foram 8,42 e 8,28, respectivamente. Este valores correspondem as concentrações de IC_{50} de aproximadamente 30 pM.

Exemplo 10

Um estudo da reatividade cruzada de um prévio tecido em humanos e tecidos cinomolgos mostrou que ch5D12 (PG100) ligam-se à superfície das células das células B e Dc em órgãos linfóides. Nenhuma reatividade cruzada não esperada foi observada em tecidos humanos ou cinomolgos. Este estudo foi repetido por PG102 e os resultados foram similarmente obtidos (dados não mostrados) indicam que o ch5D12 (PG100) e PG102 ligam-se a uma variedade de seções de tecidos em uma maneira similar.

Também uma segurança prévia e avaliação da tolerabilidade por ch5D12 foi realizada em macacos cinomolgos, em que a administração semanalmente de ch5D12 por 4 semanas foi mostrado a ser seguro e sem qualquer efeito colateral em todos os macacos. Neste estudo, a evidência funcional foi obtida que o ch5D12 pode evitar a ativação da célula B e

proliferação²⁷. Os estudos de segurança foram repetidos por PG102 usando mais um protocolo prolongado. Resumidamente, na semana 13 o estudo de toxicidade intravenosa em macaco cinomolgos como na semana 14 recupera o período que foi projetado, usando 3 níveis de dosagem (0, 25 e 100 mg/kg i.v.) e 26 macacos (6 macacos (3M, 3F) por grupo de tratamento, mais 4 macacos (2M, 2F) como grupos de recuperação em cada ramificação do tratamento ativo). As medições seguintes foram feitas: TK, respostas anti-PG102, citometria de fluxo (incluindo revestimento CD40 de PBMC), biopsia de linfonodo e taxações de toxicidades padrão tal como hematologia e imuno-histoquímica.

Os resultados destes estudos demonstraram que não existem toxicidade observada for qualquer dos níveis de dosagem testados. O PG102 foi seguro e bem tolerado.

Estes estudos coletivamente demonstram que o antagonista anti-CD40 humano Mab PG102, como este anticorpo de origem ch5D12 (PG100), tem nenhuma reatividade cruzada não esperada, e é seguro e bem tolerado in vivo.

Tabela 6: oligonucleotídeos mutagênicos. Os oligonucleotídeos usados para introduzir as mutações nas posições do aminoácido 29 e 37. Os oligonucleotídeos de sentido e anti-sentido (rev) são listados.

Iniciador	Seqüência 5' - 3'
I29V	gcactgtctctgggttctcagtctctagatatagtgatac
I29Vrev	gtatacactatatctagagactgagaaccagagacagtgc
I29L	gcactgtctctgggttctcactctccagatatagtgatac
I29Lrev	gtatacactatatctggagagtgagaaccagagacagtgc
I37L	gatatagtgtatactggctgcgcagcctccagg
I37Lrev	cctggaggctggcgcagccagtatacactatatac
I37V	gatatagtgtatactgggttcgccagcctccagg
I37Vrev	cctggaggctggcgaaccagtgatacactatatac

Tabela 7: A criação de mutantes duplos requeridos pelo ciclo 2 de mutagênese. Abaixo é listado que as séries iniciadoras foram usadas na etapa 1 e etapa 2 respectivamente para tornar-se as variantes DI5D12 adicionais.

Mutante	Etapa 1	Etapa 2
PG102 [29L-37I (LI)]	I29L+ 29Lrev	n.um.
29I-37V (IV)	I37V+I37Vrev	n.a.
29V-37I (VI)	I29V+I29Vrev	n.a.
29I-37L (IL)	I37L+I37Lrev	n.a.
29V-37V (VV)	I29V+I29Vrev	I37V+I37Vrev
29L-37L (LL)	I29L+I29Lrev	I37L+I37Lrev
29V-37L (VL)	I29V+ 29Vrev	I37L+I37Lrev
29L-37V (LV)	I29L+I29Lrev	I37V+I37Vrev

Tabela 8. Dados da expressão como medidos por ELISA quantitativa. Para cada variante 5D12 adicional (29I-37V, 29V-37I, 29I-37L, 29V-37V, 29L-37L, 29V-37L e 29L-37V), junto com ch5D12 (PG100), DI5D12 e PG102 (variante I29L), a concentração de anticorpo nos sobrenadantes coletados são mostrados.

Variante	Nome	ELISA (ng/ml)
29L-37V	ch5D12 (PG100)	2846
29I-37I	DI5D12	587
29L-37I	PG102	2226
29I-37V		1728
29V-37I		928
29I-37L		729
29V-37V		2027
29L-37L		1115
29V-37L		891
29L-37V		4263

Tabela 9: Resumo dos dados de desenvolvimento e produtividade das linhagens celulares CHO em cultura COACF do frasco de agitação por batelada de alimentação.

Cultura ID	Concentração celular máxima viável 10 ⁶ células/ml.	Período integral da concentração celular viável 10 ⁹ células.h/L	Concentração do produto em coletas mg/L	Taxa de produção específica (q _p coletadas) mg/10 ⁹ células /h	Taxa de produção específica (q _p em toda parte)
L107 (DCI)	9,66	2201	1674	0,76	0,78
L25 (DC2)	11,06	2610	1258	0,48	0,48
M95 (DC3)	9,58	2146	1173	0,55	0,58
L52	13,45	2989	1001	0,33	0,34
L73	5,95	1325	936	0,71	0,77
L45	10,48	2096	915	0,44	0,45
J3	9,20	2012	888	0,44	0,48
J4	11,02	2037	871	0,43	0,45
L97	7,55	1821	819	0,45	0,53
M92	7,82	1665	807	0,48	0,53
M59	14,65	3270	792	0,24	0,24
L102	6,20	1282	733	0,57	0,60
M58	8,78	1970	662	0,34	0,39
G20	5,73	1391	658	0,47	0,52
L65	3,74	878	651	0,74	0,90
L56	8,52	1728	546	0,32	0,30
M63	10,79	2465	444	0,18	0,18
G7	9,87	2058	376	0,18	0,20
G11	5,04	1145	310	0,27	0,30
L1	5,78	1163	263	0,23	0,21
M15	11,23	2654	121	0,05	0,04
M54	9,95	2278	276	0,12	0,15
M56	11,56	2347	27	0,01	0,01

Tabela 10: Análise GP-HPLC (incluindo LMWC)

Número de Amostra	Cultura ID	Área de pico relativo (%)			
		Agregado	Monômero	Fragmento	LMWC
1	L107	0,62	84,8	ND	14,58
2	L25	0,65	76,5	ND	22,88
3	M95	0,74	84,7	ND	14,60
4	L52	0,94	72,0	ND	27,07
5	L73	1,48	87,9	ND	10,63
6	J3	1,0	92,5	ND	6,48
7	J4	1,68	73,4	0,04	24,91
8	L97	1,66	84,4	ND	13,92
9	M92	1,18	89,4	ND	9,42
10	M59	1,55	84,8	ND	13,63

5 ND = Não Detectado

Tabela 11: Análise GP-HPLC (produtos IgG apenas)

Número de amostra	Cultura ID	Área de pico relativa (%) sem LMWC		
		Agregado total	Monômero	Fragmento
1	L107	0,72	99,3	ND
2	L25	0,84	9,2	ND
3	M95	0,87	99,1	ND
4	L52	1,28	98,7	ND
5	L73	1,66	98,3	ND
6	J3	1,08	98,9	ND
7	J4	2,24	97,7	0,05
8	L97	1,93	98,1	ND
9	M92	1,30	98,7	ND
10	M59	1,79	98,2	ND

ND = Não Detectado

Anti-CD40 mAb (batelada)	-log IC50	n
ch5D12 (PG100) (Batelada 1)	5,74 ± 0,14	4
ch5D12 (PG100) (Batelada 2)	5,64 ± 0,01	2
ch5D12 (PG100) (Batelada 3)	5,55 ± 0,06	2
ch5D12 (PG100) (Batelada 4)	5,63 ± 0,02	2
PG102 (Batelada 1)	5,85 ± 0,12	4
PG102 (Batelada 2)	5,76 ± 0,11	4

Tabela 12: Resumo dos valores calculados de -log IC50 para inibição mediada por anti-idiotipo de ch5D12 (PG100) e PG102 ligando às células JY.

- 5 Os dados indicam que os meios ± s.e. meios das determinações de n. não existe diferença significativa na potência inibidora do anti-idiotipo com qualquer batelada de anticorpo testado ($p > 0,05$, ANOVA seguido pelo teste de Tukey por múltiplas comparações).

Anti-CD40 mAb (batelada)	Concentração de ligação metade máxima de Log	n
ch5D12 (PG100) (Batelada 1)	7,54 ± 0,03	4
ch5D12 (PG100) (Batelada 2)	7,53 ± 0,02	2
ch5D12 (PG100) (Batelada 3)	7,48 ± 0,10	2
ch5D12 (PG100) (Batelada 4)	7,37 ± 0,10	2
PG102 (Batelada 1)	7,45 ± 0,04	
PG102 (Batelada 2)	7,47 ± 0,04	4

Tabela 13. Resumo dos valores das concentrações da ligação metade-máxima calculada —log por ch5D12 (PG100) e PG102 ligando ao CD40 humano-Fc, como determinados por ELISA. Os dados indicam os meios \pm s.e. meios das determinações n. Não existe diferença significativa na ligação de qualquer batelada de anticorpo testada ($p > 0,05$, ANOVA seguido pelo teste de Tukey por múltiplas comparações). Para a referência, uma concentração de ligação da metade-máxima —log de 7,45 corresponde a uma concentração de aproximadamente 35 ng/ml (~ 200 pmol).

Anti-CD40 mAb (batelada)	Concentração de ligação de metade-máxima de -log	n
ch5D12 (PG100) (Batelada 1)	7,26	2
ch5D12 (PG100) (Batelada 2)	7,34	2
ch5D12 (PG100) (Batelada 3)	7,49	2
ch5D12 (PG100) ((Batelada 4)	7,59	2
PG102 (Batelada 1)	7,44	2
PG102 (Batelada 2)	7,48	2

Tabela 14: Resumo dos valores de concentração de metade-máxima calculada —log por ch5D12 (PG100) e PG102 ligando às células JY que expressam o CD40 humano, como determinado por ELISA. Os dados indicam os meios de determinações duplicadas. Para a referência, uma concentração de metade-máxima de ligação —log de 7,45 corresponde a uma concentração de 35 ng/ml (~ 200 pmol).

Referências:

- 1 Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B71BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. J Exp Med (1993); 177: 925-35.
- 2 Hasbold J, Johnson-Leger C, Atkins CJ, Clark EA, Klaus GGB. Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. Eur J Immunol (1994); 24: 1835-42.
- 3 Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CID40 expression by monocytes: regulation by cytokines and

activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* (1993); 178: 669-74.

4 Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* (1995); 155: 4917-25.

5 Shu U, Kiniwa M, Wu CY, et al. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* (1995); 25: 1125-8.

6 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* (1996); 184: 747-52.

7 van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* (1997); 9: 330-7.

8 Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* (1994); 152: 1523-31.

9 Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, Banchereau J, Blanchard D. CD40 ligand-positive CD8⁺ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* (1995); 25: 2972-7.

10 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* (1998); 16: 111-35.

11 Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* (1998); 391: 591-4.

12 van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* (2000); 67: 2-17.

13 Clegg CH, Rulffes JT, Haugen HS, et al. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice. *Int Immunol* (1997); 9: 1111-22.

- 14 Stüber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* (1996); 183: 693-8.
- 15 Liu Z, Geboes K, Colpaert S, et al. Prevention of experimental colitis in SCID mice reconstituted with CD45RB^{high} CD4⁺ T cells by blocking the CD40-CD154 interactions. *J Immunol* (2000); 164: 6005-14.
- 16 De Jong YP, Comiskey M, Kalled SL, et al. Chronic murine colitis is dependent on the CD154/CD40 pathway and can be attenuated by anti-CD154 administration. *Gastroenterology* (2000); 119: 715-23.
- 17 Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand: *Nat Med* (2000); 6: 114.
- 18 Buhler L, Alwayn IP, Appel JZ III, Robson SC, Cooper DK. Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism. *Transplantation* (2001); 71: 491.
- 19 Knosalla C, Gollackner B, Cooper DK. Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism revisited. *Transplantation* (2002); 74: 416-17.
- 20 de Boer M, Conroy J, Min HY, Kwekkeboom J. Generation of monoclonal antibodies to human lymphocyte cell surface antigens using insect cells expressing recombinant proteins. *J Immunol Meth* (1992); 152: 15-23.
- 21 Kwekkeboom J, de Boer M, Tager JM, de Groot C. CD40 plays an essential role in the activation of human B cells by murine EL4B5 cells. *Immunology* (1993); 79: 439-44.
- 22 Kwekkeboom J, de Rijk D, Kasran A, Barcy S, de Groot C, de Boer M. Helper effector function of human T cells stimulated by anti-CD3 Mab can be enhanced by co-stimulatory signals and is partially dependent on CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* (1994); 24: 508-17.
- 23 Laman JD, 't Hart BA, Brok, HPM, et al. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* (2002); 32: 2218-28.

- 24 Boon L, Brok HPM, Bauer J, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist Mab against human CD40 is associated with altered B-cell responses. *J Immunol* (2001); 167: 2942-9.
- 5 25 Haanstra KG, Ringers J, Sick EA, et al. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates, *Transplantation* (2003); 75: 637-43.
- 26 Haegel-Kronenberger H, Haanstra K, Ziller-Remy C, et al. Inhibition of costimulation allows for repeated systemic administration of adenoviral vector in rhesus monkeys. *Gene Ther* (2004); 11: 241-52.
- 10 27 Boon L, Laman JD, Ortiz-Buijsse A, et al. Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. *Toxicology* (2002); 174: 53-65.
- 28 Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* (1997); 92: 5S-11S.
- 15 29 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* (1998); 115: 182-205.
- 30 Burgio VL, Fais S, Boirivant M, Perrone A, Pallone F. Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease. *Gastroenterology* (1995); 109: 1029-38.
- 20 31 Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, Fausa O, Scott H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* (1994); 35: 669-74.
- 32 Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, et al. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. *J Immunol* (1996); 157: 1261-70.
- 25 33 Mullin GE, Maycon ZR, Braun-Elwert L, et al. Inflammatory bowel disease mucosal biopsies have specialized lymphokine mRNA profiles. *Inflam Bowel Dis* (1996); 2: 16-26.
- 34 Pospai, D, Rene E, Fiasse R, et al. Crohn's disease stable remission after

human immunodeficient virus infection. *Dig Dis Sci* (1998); 43: 412-9.

35 Stronkhorst A, Radema S, Yong SL, et al. CD4 antibody treatment in patients with active Crohn's disease: a phase 1 dose finding study. *Gut* (1997); 40: 320-7.

5 36 Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* (1993); 75: 253-61,

37 Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller K. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* (1993); 75: 263-74.

10 38 Powrie F, Leach MM, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RA. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in SCID mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* (1994); 1: 553-62.

15 39 Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, et al. Hyperexpression of CD40 Ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its role in pathogenic cytokine production. *J Immunol* (1999); 163: 4049-57.

40 D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum in Crohn's disease. *Gastroenterology* (1998); 114: 262-7.

20 41 Cornillie F, Shealy D, D'Haens G, et al. Infliximab induces potent anti-inflammatory and local immunomodulatory activity but no systemic immune suppression in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2001); 15: 2041-2.

25 42 Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* (2003); 92: 1041-8.

43 Van Assche G, Rutgeerts P. Anti-TNF agents in Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs* (2000); 9: 103-11.

44 Stüber E, Strober W, Neurath M. Blocking the CD40L-CD40 interaction in

vivo specifically prevents the priming of T helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med* (1996);183:693-698.

45 Ranheim EA, Kipps TJ. Activated T cells induce expression of B7/BB1 on normal or leukemic B cells through a CD40-dependent signal. *J Exp Med* (1993);177:925-935.

46 Hasbold J, Johnson-Leger C, Atkins CJ, Clark EA, Klaus GGB. Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies. *Eur J Immunol* (1994);24:1835-1842.

47 Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. CD40 expression by monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J Exp Med* (1993);178:669-674,

48 Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol* (1995);155:4917-4925.

49 Shu U, Kiniwa M, Wu CY, Maliszewski C, Vezzio N, Hakimi J, Gately M, Delespesse G. Activated T cells induce interleukin-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interaction. *Eur J Immunol* (1995);25:1125-1128.

50 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* (1996);184:747-752.

51 van Kooten C, Banchereau J. Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol* (1997);9:330-337.

52 Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* (1994);152:1523-1531.

53 Hermann P, Van-Kooten C, Gaillard C, Banchereau J, Blanchard D. CD40

ligand-positive CD8⁺ T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur J Immunol* (1995);25:2972-2977.

54 Grewal IS, Flavell RA. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* (1998);16:111-135.

5 55 Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* (1998);391:591-594.

56 Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Saeland S. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* (1994);12:881-922.

57 Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ. Immune regulation by CD40 and its ligand gp39. *Annu Rev Immunol* (1996);14:591-617.

15 58 Kato T, Hakamada R, Yamane H, Nariuchi H. Induction of IL-12 p40 messenger RNA expression and IL-12 production of macrophages via CD40-CD40 ligand interaction. *J Immunol* (1996);156:3932-3938.

59 Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, Pauli G. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF- α , but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* (1995);25:1943-1950

60 Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Disteché CM, Simoneaux DK, Fanshow WC, Belmont J, Spriggs MK. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* (1993);259:990-993.

25 61 Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* (1994);1:423-431.

62 Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature* (1995);378:617-620.

- 63 Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol* (1996);156:8-11.
- 64 Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P,
5 Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafo V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrabamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* (1997);131:47-54.
- 65 Soong L, Xu JC, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley BJ Jr, Ruddle NH,
10 McMahon-Pratt D, Flavell RA. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity* (1996);4:263-273.
- 66 Campbell KA, Ovendale PJ, Kennedy MK, Fanslow WC, Reed SG,
15 Maliszewski CR. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. *Immunity* (1996);4:283-289.
- 67 Clegg CH, Rulffes JT, Haugen HS, Hoggatt IH, Aruffo A, Durham SK, Farr AG, Hollenbaugh D. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice. *Int Immunol* (1997);9:1111-1122.
- 68 Parker et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1995) 92:9560
- 69 Haanstra KG, Ringers J, Sick EA, Ramdien-Murli S, Kuhn EM, Boon L, Jonker M. Prevention of kidney allograft rejection using anti-CD40 and anti-CD86 in primates. *Transplantation*. (2003);75(5):637-43.
- 70 Haanstra KG, Sick EA, Ringers J, Wubben JAM, Kuhn EM, Boon L,
25 Jonker M. Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of Rhesus Monkey kidney allografts. *Transplantation*. (2005); 79: 1623-1626.
- 71 Boon L, Brok HP, Bauer J, Ortiz-Buijsse A, Schellekens MM, Ramdien-Murli S et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in

the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist monoclonal antibody against human CD40 is associated with altered B cell responses. *J Immunol* (2001); 167:2942-2949.

72 Laman JD, 't Hart BA, Brok H, Meurs M, Schellekens MM, Kasran A et al. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol* (2002); 32:2218-2228.

73 Boon L, Laman JD, Ortiz-Buijsse A, den Hartog MT, Hoffenberg S, Liu P et al. Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cynomolgus monkeys. *Toxicology* (2002); 174:53-65.

74 Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab ch5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* (2005);22:111-22.

75 Haanstra KG, Sick EA, Ringers J, Wubben JA, Kuhn EM, Boon L, Jonker M. Costimulation blockade followed by a 12-week period of cyclosporine A facilitates prolonged drug-free survival of rhesus monkey kidney allografts. *Transplantation.* (2005);79:1623-6.

76 't Hart BA, Blezer EL, Brok HP, Boon L, de Boer M, Bauer J, Laman JD. Treatment with chimeric anti-human CD40 antibody suppresses MRI-detectable inflammation and enlargement of pre-existing brain lesions in common marmosets affected by MOG-induced EAE. *J Neuroimmunol.* (2005);163:31-9.

77 Koenen HJ, den Hartog MT, Heerkens S, Fasse E, Ortiz-Buijsse A, van Neerven RJ, Simons PJ, Joosten I, Boon L. A novel bispecific antihuman CD40/CD86 fusion protein with t-cell tolerizing potential. *Transplantation.* (2004);78:1429-38.

78 de Vos AF, Melief MJ, van Riel D, Boon L, van Eijk M, de Boer M, Laman JD. Antagonist anti-human CD40 antibody inhibits germinal center formation in cynomolgus monkeys. *Eur J Immunol.* (2004);34:3446-55.

- 79 Laman JD, 't Hart BA, Brok H, Meurs M, Schellekens MM, Kasran A, Boon L, Bauer J, Boer M, Ceuppens J. Protection of marmoset monkeys against EAE by treatment with a murine antibody blocking CD40 (mu5D12). *Eur J Immunol.* (2002);32:2218-28.
- 5 80 Boon L, Laman JD, Ortiz-Buijsse A, den Hartog MT, Hoffenberg S, Liu P, Shiau F, de Boer M. Preclinical assessment of anti-CD40 Mab 5D12 in cinomolgus monkeys. *Toxicology.* (2002);174:53-65.
- 81 Boon L, Brok HP, Bauer J, Ortiz-Buijsse A, Schellekens MM, Ramdien-Murli S, Blezer E, van Meurs M, Ceuppens J, de Boer M, 't Hart BA, Laman JD. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using a chimeric antagonist monoclonal antibody against human CD40 is associated with altered B cell responses. *J Immunol.* (2001);167:2942-9.
- 15 82 S.G. Antunes, N.G. de Groot, H. Brok, G. Doxiadis, A.A. Menezes, N. Doing and R.E. Bontrop, The common marmoset: a new world primate species with limited Mhc class II variability, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998);95:, 11745-11750.
- 20 83 B. Becher, B.G. Durell, A.V. Miga, W.F. Hickey and R.J. Noelle, The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system, *J. Exp. Med.* (2001);193:. 967-974.
- 84 R.E. Bontrop, N. Otting, N.G. de Groot and G.G. Doxiadis, Major histocompatibility complex class II polymorphisms in primates, *Immunol. Rev.* (1999);167:. 339-350.
- 25 85 H.P. Brok, A. Uccelli, N. Kerlero De Rosbo, R.E. Bontrop, L. Roccatagliata, N.G. de Groot, E. Capello, J.D. Laman, K. Nicolay, G.L. Mancardi, A. Ben-Nun and B.A. 't Hart, Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis in common marmosets: the encephalitogenic T cell epitope pMOG24-36 is presented by a

monomorphic MHC class II molecule, *J. Immunol.* (2000);165: 1093-1101.

86 H.P. Brok, J. Bauer, M. Jonker, E. Blezer, S. Amor, R.E. Bontrop, J.D. Laman and B.A. 't Hart, Non-human primate models of multiple sclerosis, *Immunol. Rev.* (2001);183: 173-185.

5 87 C.P. Genain and S.L. Hauser, Experimental allergic encephalomyelitis in the New World monkey *Callithrix jacchus*, *Immunol. Rev.* (2001);183: 159-172.

88 K. Gerritse, J.D. Laman, R.J. Noelle, A. Aruffo, J.A. Ledbetter, W.J. Boersma and E. Claassen, CD40-CD40 ligand interactions in experimental
10 allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1996);93: 2499-2504.

89 A.M. Girvin, M.C. Dal Canto and S.D. Miller, CD40/CD40L interaction is essential for the induction of EAE in the absence of CD28-mediated co-stimulation, *J. Autoimmun.* (2002);18:83-94.

15 90 L.S. Grewal and R.A. Flavell, A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4⁺ T-cell responses, *Immunol. Today* (1996);17:410-414.

91 L.M. Howard, A.J. Miga, C.L. Vanderlugt, M.C. Dal Canto, J.D. Laman, R.J. Noelle and S.D. Miller, Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-CD40L (CD 154) antibody in an animal model of multiple sclerosis, *J.*
20 *Clin. Invest.* (1999);103:281-290.

92 E.K. Jordan, H.I. McFarland, B.K. Lewis, N. Tresser, M.A. Gates, M. Johnson, M. Lenardo, L.A. Matis, H.F. McFarland and J.A. Frank, Serial MR imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by human white matter or by chimeric myelin-basic and proteolipid protein in the
25 common marmoset, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* (1999);20:965-976.

93 J.D. Laman, E. Claassen and R.J. Noelle, Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L), *Crit. Rev. Immunol.* (1996),16:59-108.

94 J.D. Laman, C.B. Maassen, M.M. Schellekens, L. Nisei, M. Kap, E. de Jong, M. van Puijenbroek, M.J. van Stipdonk, M. van Meurs, C. Schwarzler

and U. Gunthert, Therapy with antibodies against CD40L (CD 154) and CD44 variant isoforms reduces experimental autoimmune encephalomyelitis induced by a proteolipid protein peptide, *Mult. Scler.* (1998);4: 147-153.

95 J.D. Laman, M. van Meurs, M.M. Schellekens, M. de Boer, B. Melchers,
5 L. Massacesi, H. Lassmann, E. Claassen and B.A. 't Hart, Expression of accessory molecules and cytokines in acute EAE in marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*), *J. Neuroimmunol.* (1998);86:30-45.

96 J. Mestas and C.C. Hughes, Of mice and not men: differences between mouse and human immunology, *J. Immunol.* (2004);172: 2731-2738.

10 97 S.A. Quezada, L.Z. Jarvinen, E.F. Lind and R.J. Noelle, CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity, *Annu. Rev. Immunol.* (2004);22:307-328.

98 C.S. Raine, B. Cannella, S.L. Hauser and C.P. Genain, Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: a
15 case for antigen-specific antibody mediation, *Ann. Neural.* (1999);46:144-160.

99 D.H. Sachs, Tolerance: of mice and men, *J. Clin. Invest.* (2003);111:1819-1821.

100 E.B. Samoilova, J.L. Horton, H. Zhang and Y. Chen, CD40L blockade
20 prevents autoimmune encephalomyelitis and hampers TH1 but not TH2 pathway of T cell differentiation, *J. Mol. Med.* (1997);75: 603-608.

101 B.A. 't Hart, J. Bauer, H.J. Muller, B. Melchers, K. Nicolay, H. Brok, R.E. Bontrop, H. Lassmann and L. Massacesi, Histopathological characterization of magnetic resonance imaging-detectable brain white matter
25 lesions in a primate model of multiple sclerosis: a correlative study in the experimental autoimmune encephalomyelitis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*), *Am. J. Pathol.* (1998);153:649-663.

102 B.A. 't Hart, M. van Meurs, H.P. Brok, L. Massacesi, J. Bauer, L. Boon, R.E. Bontrop and J.D. Laman, A new primate model for multiple sclerosis in

the common marmoset, *Immunol. Today*(2000);21:290-297.

103 B. 't Hart, S. Amor and M. Jonker, Evaluating the validity of animal models for research into therapies for immune-based disorders, *Drug Discov. Today* (2004);9: 517-524.

5 104 't Hart et al., 2004b B.A. 't Hart, J.D. Laman, J. Bauer, E.D. Blezer, Y. van Kooyk and R.Q. Hintzen, Modelling of multiple sclerosis: lessons learned in a non-human primate, *Lancet Neurol* (2004);3: 589-597.

105 B.A. 't Hart, J. Vogels, J. Bauer, H.P. Brok and E. Blezer, Non-invasive measurement of brain damage in a primate model of multiple sclerosis, 10 *Trends Mol. Med.* (2004);10: 85-91.

106 B.A. 't Hart, J.T. Vogels, J. Bauer, H.P.M. Brok and E. Blezer, Non-invasive measurement of brain damage in a primate model of multiple sclerosis, *Trends Mol. Med.* (2004);10: 85-91.

107 P. Villoslada, K. Abel, N. Heald, R. Goertsches, S.L. Hauser and C.P. 15 Genain, Frequency, heterogeneity and encephalitogenicity of T cells specific for myelin oligodendrocyte glycoprotein in naive outbred primates, *Eur. J Immunol.* (2001);31: 2942-2950.

108 Bata-Csorgo Z, Hammerberg C, Voorhees JJ, Cooper K.D. Intralesional T-lymphocyte activation as a mediator of psoriatic epidermal hyperplasia. J 20 *Invest Dermatol* (1995); 105(1 Suppl): 89S-94S.

109 Bos JD, De Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* (1999); 20: 40-46.

110 Lebwohl M. Psoriasis. *Lancet* (2003); 361: 1197-1204.

111 van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* (2000); 25 67: 2-17.

112 Peguet-Navarro J, Dalbiez-Gauthier C, Moulon C, et al. CD40 ligation of human keratinocytes inhibits their proliferation and induces their differentiation. *J Immunol* (1997); 158: 144-152.

113 Denfeld RW, Hollenbaugh D, Fehrenbach A, et al. CD40 is functionally

expressed on human keratinocytes. Eur J Immunol (1996); 26: 2329-2334.

114 Gaspari AA, Sempowski GD, Chess P, Gish J, Phipps RP. Human epidermal keratinocytes are induced to secrete interleukin-6 and co-stimulate T lymphocyte proliferation by a CD40-dependent mechanism. Eur J Immunol (1996); 26: 1371-1377.

115 Pasch MC, Bos JD, Asghar SS. Activation de complement from psoriasis. Clin Exp Dermatol (1998); 23: 189-190.

116 Pasch MC, Timar, K, van Meus M, Heyendaal VMR, Bos JD, Laman JD, Asghar SS. In situ demonstration de CD40- and CD154-positive cells in psoriatic lesions e keratinocyte production de chemokines by CD40 ligation in vitro. Pathol (2004); 203: 839-848.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de aminoácido

1	11	21	31
GFSX ₁ S RYSVY WX ₂ RQP PGKGX ₃ EWX ₄ GM MWGGG STDYS			
41	51	61	
TSLKS RLtis KDTsk SQVX ₅ L KMNSL RTDDT AMYYC			
71			
VRTDG DY			

em que:

- 5 X₁ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou
H;
- X₂ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou
H;
- 10 X₃ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou
H;
- X₄ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou
H; e
- X₅ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou
H.

15 2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado
pelo fato de que compreende uma seqüência de aminoácido

1	11	21	31

QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX₁S RYSVY WX₂RQP

41

51

61

71

|

|

|

|

PGKGX₃ EWX₄GM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK

81

91

101

111

|

|

|

|

SQVX₅L KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que

X₁ é G, A, V, L, P, F, M, W, C, N, Q, S, T, Y, D, E, K, R ou H.

5 4. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que:

X₁ é G, A, V, L, P, F ou M;

X₂ é G, A, V, L, I, P, F ou M;

X₃ é G, A, V, L, I, P, F, M;

10 X₄ é G, A, V, L, I, P, F, M; e

X₅ é G, A, V, L, I, P, F, M, W, C, N, Q, S, T ou Y.

5. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que:

X₁ é G, A, V, L ou M;

15 X₂ é G, A, V, L, I ou M;

X₃ é G, A, V, L, I, P, F, M;

X₄ é G, A, V, L, I ou M; e

X₅ é P, F, W, N, Q, S, T ou Y.

20 6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que:

X₁ é L;

X₂ é I;

X_3 é P;

X_4 é M; ou

X_5 é S.

5 7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2,
caracterizado pelo fato de que:

X_1 é I e X_2 é V;

X_1 é L e X_2 é I;

X_1 é V e X_2 é V;

X_1 é L e X_2 é L; ou

10 X_1 é L e X_2 é V.

8. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado
pelo fato de que

X_3 é P;

X_4 é M; e

15 X_5 é F ou X_5 é S, preferivelmente S;

9. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das
reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que:

X_1 é L; X_2 é V; X_3 é L; X_4 é L e X_5 é F.

20 10. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que compreende a
seqüência de aminoácido

1	11
GFSX₁S RYSVY WX₂R	

em que:

X_1 é L e X_2 é I; ou

X_1 é I e X_2 é V.

25 11. Corpo de ligação, caracterizado pelo fato de que
compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das
reivindicações de 1 a 10.

12. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10.

13. Anticorpo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende uma região constante de um anticorpo humano, preferivelmente uma região constante de IgG.

14. Anticorpo de acordo com as reivindicações 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a dita região constante é uma região que é deficiente em ativação de complemento, preferivelmente a região constante de IgG₄ humana ou uma região constante de IgG₁ humana mutada.

15. Ácido nucleico, caracterizado pelo fato de que codifica um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, e/ou um corpo de ligação como definido na reivindicação 11, e/ou um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 12 a 14.

16. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, um corpo de ligação como definido na reivindicação 11, e/ou um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 12 a 14 e/ou um ácido nucleico como definido na reivindicação 15.

17. Anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico, caracterizado pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10.

18. Anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico desimmunizado, caracterizado pelo fato de que ser como definido na reivindicação 17.

19. Anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico de acordo com as reivindicações 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácido

1	11	21	31
X ₆ LGX ₇ X ₈ ASISC RSSQS LX ₉ NSN GNTYL HWYLQ RPGQS			
41	51	61	71
PRLLI YKVSN RFSGV PDRFS GSGSG TDFTL KISRV EAEDX ₁₀			

81	91
GVYX ₁₁ C SQSTH VPWT	

em que:

X₆ é N, Q, S, T, Y, W ou C;

X₇ é D, E, N, Q, S, T, Y, W ou C;

X₈ é N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W ou C;

X₉ é G, A, V, L, I, P, F, M;

X₁₀ é G, A, V, L, I, P, F, M; e

X₁₁ é N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, I, P, F, M, W ou C.

20. Anticorpo monoclonal CD40 anti-humano antagonístico de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende uma seqüência de aminoácido

1	11	21	31
ELQLT QSPLS LPVX ₆ L GX ₇ X ₈ AS ISCRS SQSLX ₉ NSNGN TYLHW			
41	51	61	71
YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI			
81	91	101	111
SRVEA EDX ₁₀ GV YX ₁₁ CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR			

21. Anticorpo de acordo com a reivindicação 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que

X_6 é T ou S, X_7 é D ou Q, X_8 é Q ou P, X_9 é V ou A, X_{10} é V ou L e X_{11} é F ou Y.

5 22. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 19 a 21, caracterizado pelo fato de que:

X_6 é T, X_7 é Q, X_8 é P, X_9 é A, X_{10} é V e X_{11} é Y.

23. Célula, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 19 a 22.

10 24. Célula de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que produz o dito anticorpo.

25. Célula de acordo com as reivindicações 16, 23 ou 24, caracterizada pelo fato de que é uma célula de hibridoma, uma célula do ovário do hamster chinês, uma célula NSO ou uma célula PER-C6[®].

15 26. Célula de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que está depositada sob o número ..., na coleção

27. Cultura de célula, caracterizada pelo fato de que compreende uma célula como definida em qualquer uma das reivindicações de 23 a 26.

20 28. Método para produzir um anticorpo, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma célula como definida em qualquer uma das reivindicações 16, de 23 a 26 e colher o dito anticorpo da dita cultura.

29. Anticorpo, caracterizado pelo fato de que é obtenível por um método como definido na reivindicação 28.

25 30. Anticorpo de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que é purificado.

31. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, um corpo de ligação como definido na reivindicação

11, um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 12 a 14, 17 a 22, 29 ou 30, um ácido nucleico como definido na reivindicação 15 e/ou uma célula como definida nas reivindicações 16, de 23 a 26.

5 32. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, um corpo de ligação de acordo com a reivindicação 11, um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 12 a 14, 17 a 22, 29 ou 30, um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 15 e/ou uma célula de acordo com as reivindicações 16, 23 a 26, caracterizados pelo fato de que são para o uso como um medicamento.

10 33. Uso de um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, um corpo de ligação como definido na reivindicação 11, um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 12 a 14, 17 a 22, 29 ou 30, um ácido nucleico como definido na reivindicação 15 e/ou uma célula como definida nas
15 reivindicações 16, de 23 a 26, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de um medicamento para melhorar um sintoma de um distúrbio autoimune e/ou um distúrbio inflamatório e/ou para reduzir a rejeição a enxerto e/ou para o tratamento de cânceres positivos em CD40.

20 34. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune e/ou inflamatório é selecionado do grupo de artrite reumatóide, lupo eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, psoríase, penfigóides bolhosos e dermatite atópica.

25 35. Uso de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio autoimune e/ou inflamatório compreende a doença do intestino inflamatório.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que a dita doença do intestino inflamatório compreende colite ulcerativa (UC) ou doença de Crohn (CD).

37. Método para munir um indivíduo com um anticorpo,

caracterizado pelo fato de que compreende munir o dito indivíduo com um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações de 12 a 14, 17 a 22, 29 ou 30.

38. Método para selecionar um anticorpo antagonista de CD40 anti-humano, caracterizado pelo fato de que compreende gerar uma primeira linhagem de célula que produza um anticorpo antagonista de CD40 anti-humano original e determinar a quantidade de anticorpo original que é produzido pela dita primeira linhagem de célula, o dito anticorpo original compreendendo a sequência de aminoácido do domínio variável da cadeia pesada

1	11	21	31
QVKLQ ESGPG LVKPS ETL SI TCTVS GFSX ₁ S RYSVY WX ₂ RQP			
41	51	61	71
PGKGP EWMGM MWGGG STDYS TSLKS RLTIS KDTSK			
81	91	101	111
SQVSL KMNSL RTDDT AMYYC VRTDG DYWGQ GTTVT VSS			

em que X_1 e X_2 são selecionados aos pares do grupo que consiste de $X_1 = I$ e $X_2 = V$; $X_1 = L$ e $X_2 = I$; $X_1 = V$ e $X_2 = V$; $X_1 = L$ e $X_2 = L$; ou $X_1 = L$ e $X_2 = V$,

o dito método compreendendo ainda

gerar pelo menos uma outra linhagem de célula que produza uma variante do dito anticorpo original em que o dito anticorpo variante é um anticorpo original modificado que compreende uma inserção, deleção, inversão, e/ou substituição dentre cerca de 1 a 5 aminoácidos quando comparado com o dito anticorpo original, em que a dita modificação não consiste de uma modificação dos aminoácidos na(s) posição(ões)

identificada(s) por X_1 e X_2 , e determinar a quantidade de anticorpo variante que é produzido pela dita pelo menos uma outra linhagem de célula,

o dito método compreendendo ainda selecionar um anticorpo variante que foi produzido em uma quantidade que foi pelo menos 50% da quantidade do anticorpo original.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo original compreende a seqüência de aminoácido da cadeia leve

1	11	21	31
ELQLT QSPLS LPV T L G Q P AS ISCRS SQSL A NSNGN TYLHW			
41	51	61	71
YLQRP GQSPR LLIYK VSNRF SGVPD RFSGS GSGTD FTLKI			
81	91	101	111
SRVEA ED V GV Y Y CSQ STHVP WTFGG GTKLE IKR.			

40. Método de acordo com as reivindicações 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que a dita inserção, deleção, inversão, e/ou substituição dentre cerca de 1 a 5 aminoácidos está na dita seqüência de aminoácido de cadeia pesada ou na dita seqüência de aminoácido de cadeia leve quando comparada com a seqüência de aminoácido de cadeia correspondente no dito anticorpo original.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que a dita inserção, deleção, inversão, e/ou substituição dentre cerca de 1 a 5 aminoácidos está na dita seqüência de aminoácido de cadeia pesada quando comparada com a dita seqüência de cadeia pesada do dito anticorpo original.

42. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 38 a 41, caracterizado pelo fato de que compreende ainda gerar uma linhagem de célula produtora de anticorpo que produz o dito anticorpo selecionado.

5 43. Método de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que compreende ainda coletar o dito anticorpo selecionado.

44. Anticorpo antagonista de CD40 anti-humano, caracterizado pelo fato de que é obtenível por um método como definido na reivindicação 43.

Figura 1

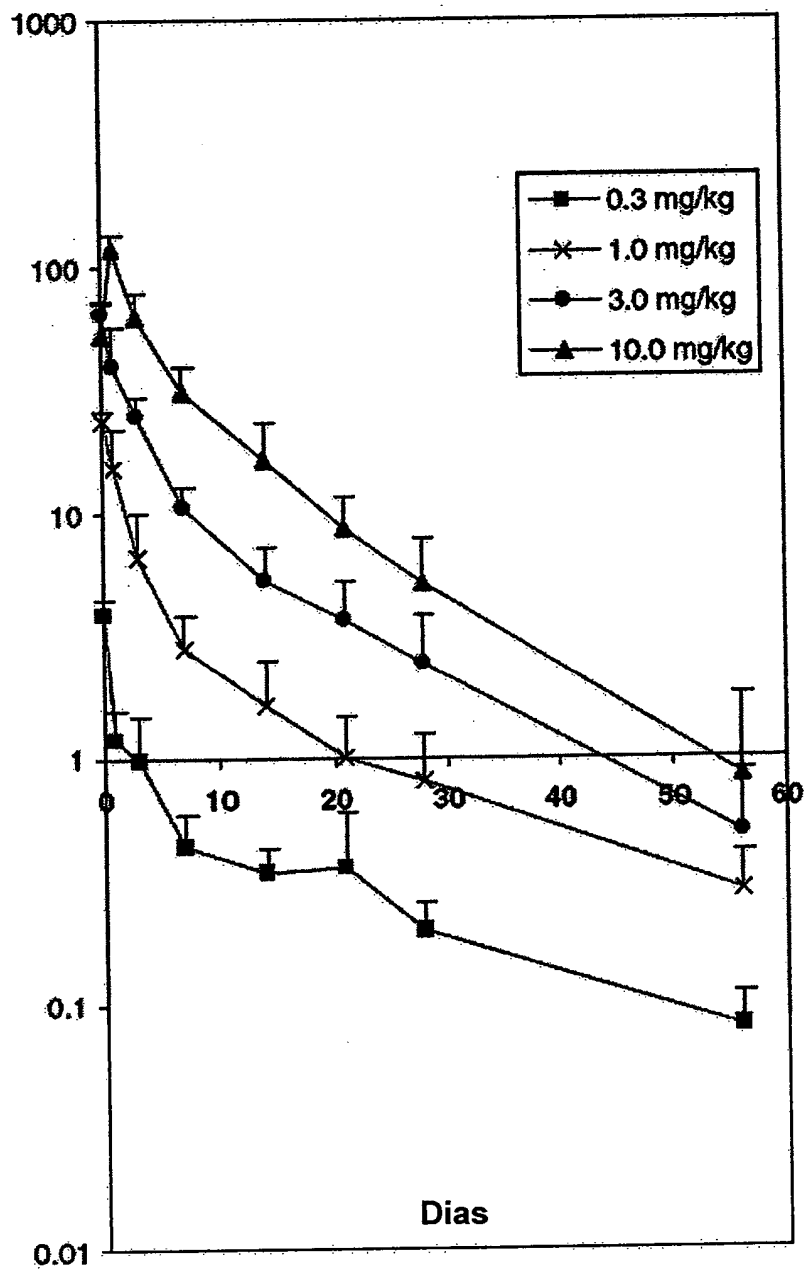


Figura 2

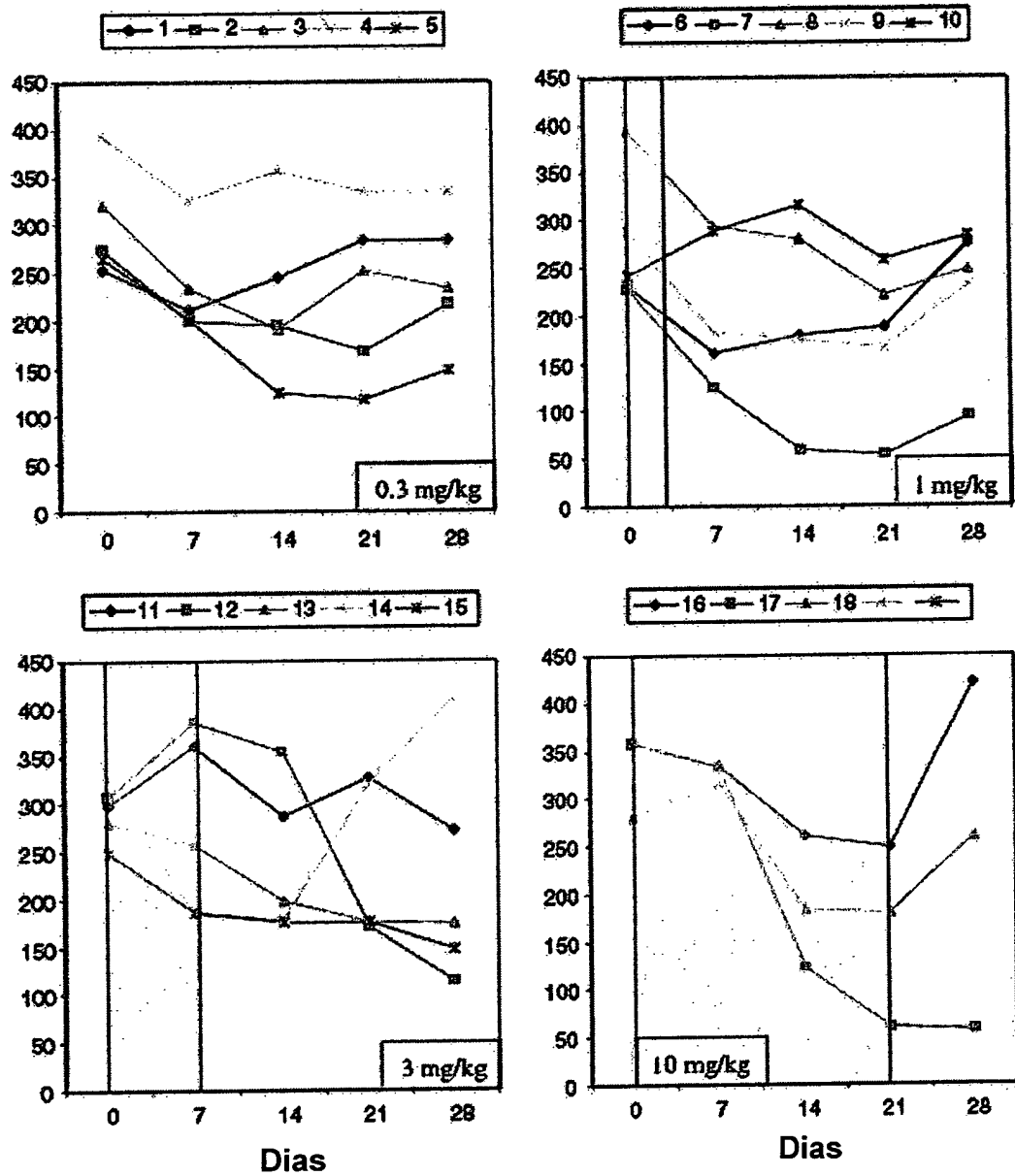


Figura 3

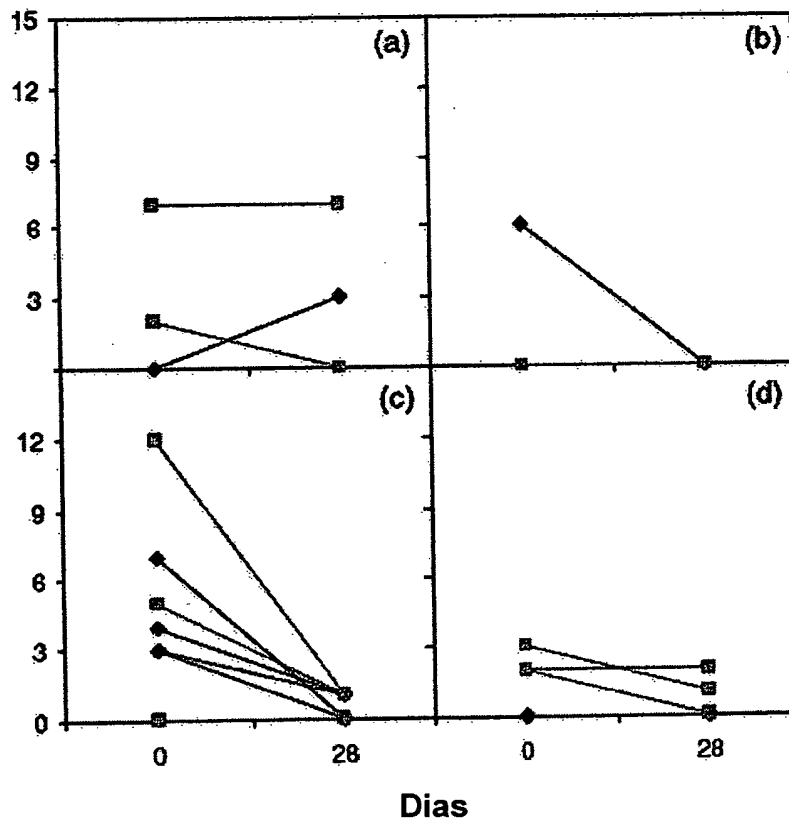


Figura 4

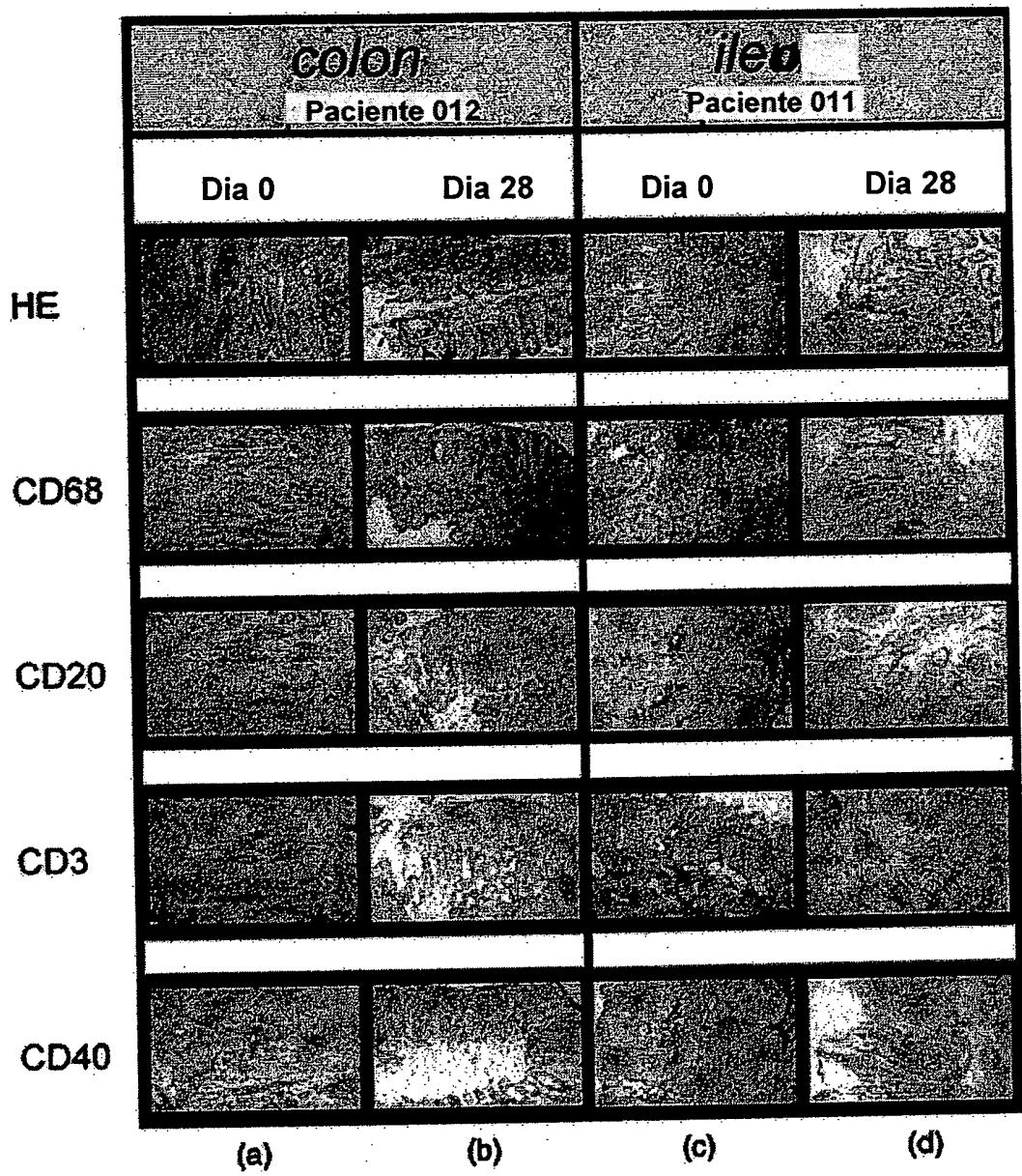


Figura 5

região MuD12 VH

Q V K L	E E S	G P G	L V A P	S Q S	L S I
10	20	30	40	50	60
CAGGTCAAGC	TCGAGGAGTC	TGGACCTGGC	CTGGTGGCAC	CCTCACAGAG	CCTGTCCATC
GTCCAGTTCG	AGCTCCTCAG	ACCTGGACCG	GACCACCGTG	GGAGTGTCTC	GGACAGGTAG
T C T V	S G F	S L S	R Y S V	Y W V	R Q P
70	80	90	100	110	120
ACATGCACTG	TCTCTGGGTT	CTCATTATCC	AGATATAGTG	TATACTGGGT	TCGCCAGCCT
TGTACGTGAC	AGAGACCCAA	GAGTAATAGG	TCTATATCAC	ATATGACCCA	AGCGGTCGGA
P G K G	L E W	L G M	M W G G	G S T	D Y N
130	140	150	160	170	180
CCAGGAAAGG	GTCTGGAGTG	GCTGGGAATG	ATGTGGGGTG	GTGGATCCAC	AGACTATAAT
GGTCCTTTCC	CAGACCTCAC	CGACCCTTAC	TACACCCAC	CACCTAGGTG	TCTGATATTA
S A L K	S R L	S I S	K D T S	K S Q	V F L
190	200	210	220	230	240
TCAGCTCTCA	AATCCAGACT	GAGCATCAGC	AAGGACACCT	CGAAGAGCCA	GGTCTTCTTA
AGTCGAGAGT	TTAGGTCTGA	CTCGTAGTCG	TTCTGTGGA	GCTTCTCGGT	CCAGAAGAAT
K M N S	L R T	D D T	A M Y Y	C V R	T D G
250	260	270	280	290	300
AAAATGAACA	GTCTGCGAAC	TGATGACACA	GCCATGTACT	ACTGTGTCAG	AACCGATGGG
TTTTACTTGT	CAGACGCTTG	ACTACTGTGT	CGGTACATGA	TGACACAGTC	TTGGCTACCC
D Y W G	Q G T	S V T	V S S		
310	320	330	339		
GACTACTGGG	GTCAAGGAAC	CTCAGTCACC	GTCTCCTCA		
CTGATGACCC	CAGTTCCTTG	GAGTCAGTGG	CAGAGGAGT		

região Mu5D12 VL

E L Q L	T Q S	P L S	L P V S	L G D	Q A S
10	20	30	40	50	60
GAGCTCCAGC	TGACCCAGTC	TCCACTCTCC	CTGCCTGTCA	GTCTTGAGGA	TCAAGCCTCC
CTCGAGGTCTG	ACTGGGTCAG	AGGTGAGAGG	GACGGACAGT	CAGAACCTCT	AGTTCCGAGG
I S C R	S S Q	S L V	N S N G	N T Y	L H W
70	80	90	100	110	120
ATCTCTTGCA	GATCTAGTCA	GAGCCTTGTA	AACAGTAATG	GAAACACCTA	TTTACATTGG
TAGAGAACGT	CTAGATCAGT	CTCGGAACAT	TTGTCAATTAC	CTTTGTGGAT	AAATGTAACC
Y L Q K	P G Q	S P K	L L I Y	K V S	N R F
130	140	150	160	170	180
TACCTGCAGA	AGCCAGGCCA	GTCTCCAAAG	CTCCTGATCT	ACAAAGTTTC	CAACCGATTT
ATGGACGTCT	TCGGTCCGGT	CAGAGGTTTC	GAGGACTAGA	TGTTTCAAAG	GTTGGCTAAA
S G V P	D R F	S G S	G S G T	D F T	L K I
190	200	210	220	230	240
TCTGGGGTCC	CAGACAGGTT	CAGTGGCAGT	GGATCAGGGA	CAGATTTTAC	ACTCAAGATT
AGACCCAGG	GTCTGTCCAA	GTCACCGTCA	CCTAGTCCCT	GTCTAAAGTG	TGAGTTCTAA
S R V E	A E D	L G V	Y F C S	Q S T	H V P
250	260	270	280	290	300
AGCAGAGTGG	AGGCTGAGGA	TCTGGGAGTT	TATTTCTGCT	CTCAAAGTAC	ACATGTTCCG
TCGTCTCACC	TCCGACTCCT	AGACCCCTCA	ATAAAGACGA	GAGTTTCATG	TGTACAAGGC
W T F G	G G T	K L E	I K R		
310	320	330	339		
TGGACGTTTCG	GTGGAGGCAC	CAAGCTGGAA	ATCAAACGT		
ACCTGCAAGC	CACCTCCGTG	GTTTCGACCTT	TAGTTTGCA		

Figura 6

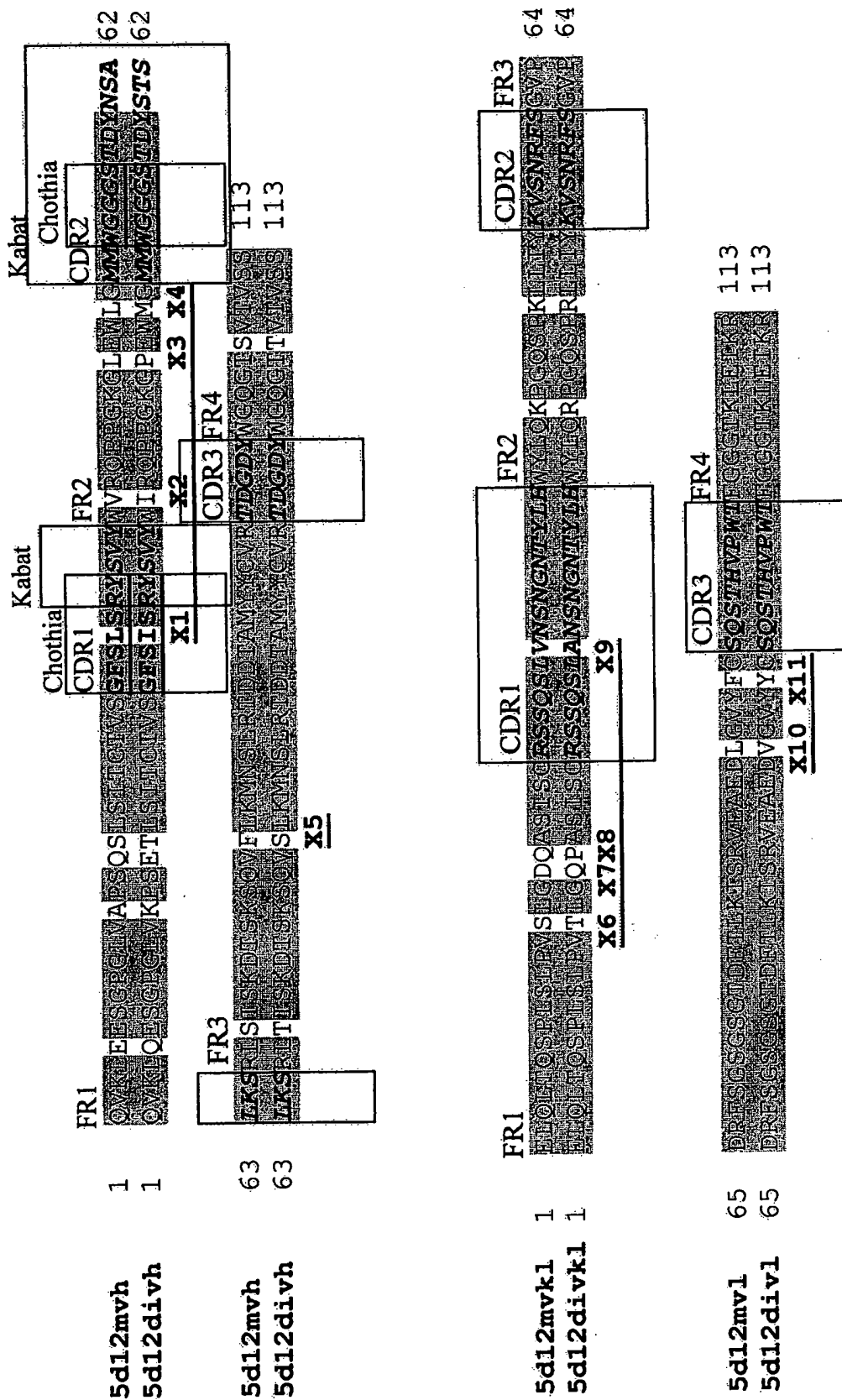


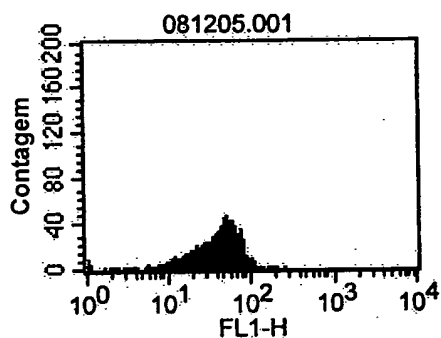
Figura 7

12 variantes DI5D12VH

1.	Q5E	1	QVKEESGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
2.	K13A	1	QVKEOSSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
3.	E16Q	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
4.	T17S	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
5.	I29L	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
6.	I37V	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
7.	P45L	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
8.	M48L	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
9.	STS60NSA	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
10.	T68S	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
11.	S79F	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
12.	T108S	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
	CH5D12	1	QVKEESGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
	DI5D12	1	QVKEQSGECIKKESETTSITCTVSGPISRYSVYTIROPFGKPPMMEMMGCGESTDYS	60
1.	Q5E	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
2.	K13A	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
3.	E16Q	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
4.	T17S	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
5.	I29L	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
6.	I37V	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
7.	P45L	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
8.	M48L	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
9.	STS60NSA	61	SAMKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
10.	T68S	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
11.	S79F	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
12.	T108S	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
	CH5D12	61	SAMKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113
	DI5D12	61	TSKGRRTTSKQDTSKQSVSKMNSRTDDTAMACVIRDDGDIWGGCITWVSS	113

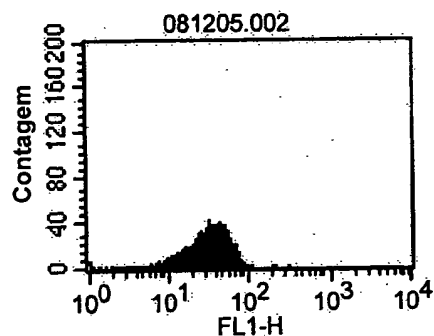
Figura 1 FACS

dados Q5E



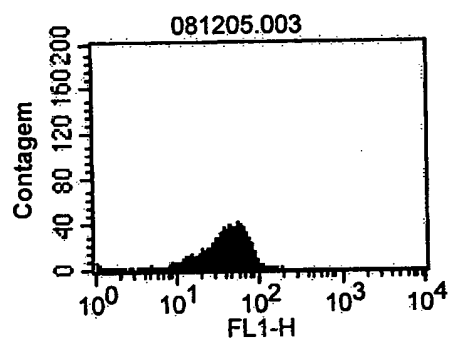
% Contada	Média	Mediana
100.00	39.05	37.52

K13A



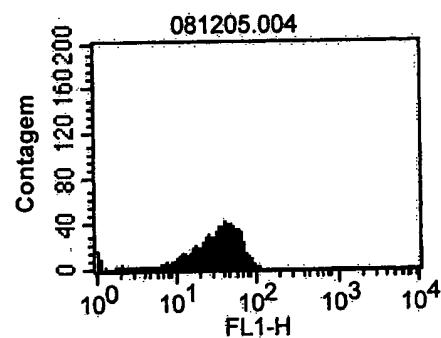
% Contada	Média	Mediana
100.00	31.22	29.96

E16Q



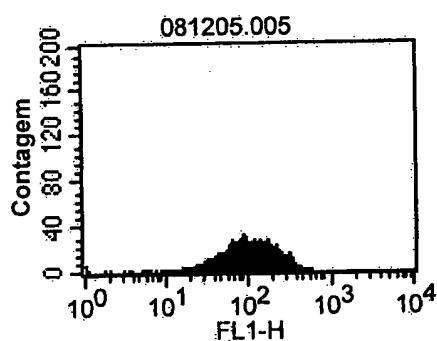
% Contada	Média	Mediano
100.00	39.48	38.20

T17S



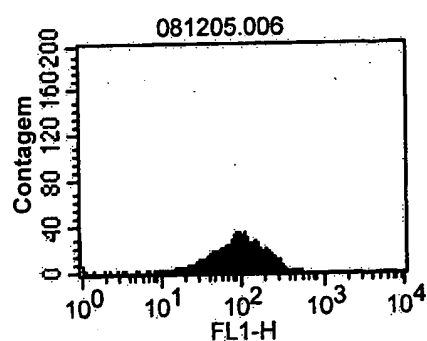
% Contada	Média	Mediano
100.00	33.43	31.91

I29L



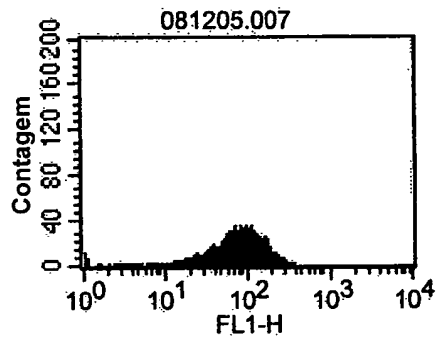
% Contada	Média	Mediano
100.00	108.28	91.81

I37V



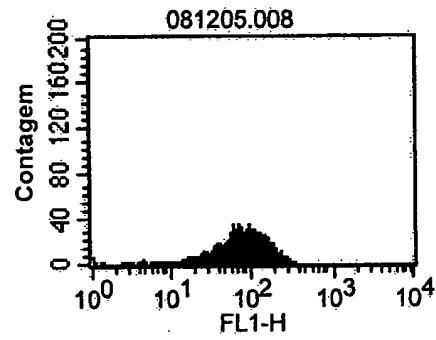
% Contada	Média	Mediano
100.00	96.05	82.05

P45L



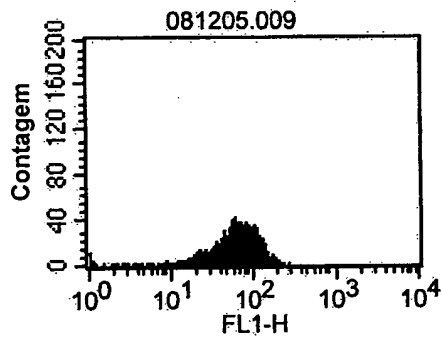
% Contada	Média	Mediano
100.00	82.53	74.32

M48L



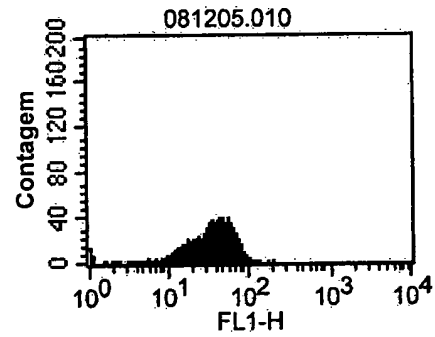
% Contada	Média	Mediano
100.00	80.30	72.34

STS60NSA



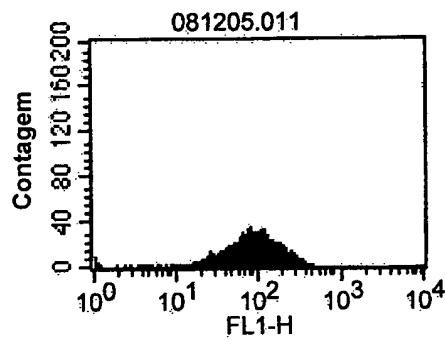
% Contada	Média	Médiano
100.00	62.37	58.82

T68S



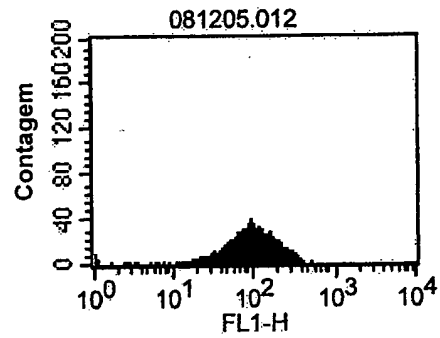
% Contada	Média	Médiano
100.00	35.21	33.98

S79F



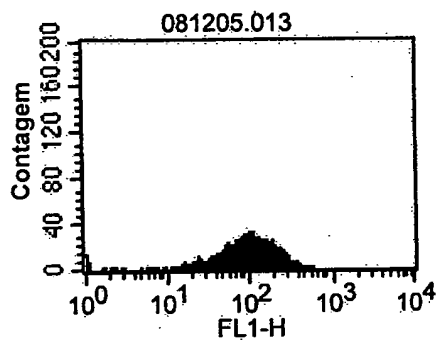
% Contada	Média	Médiano
100.00	96.40	82.05

T108S



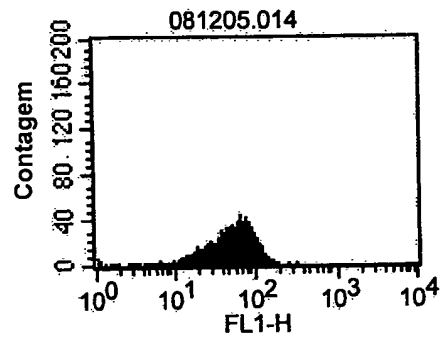
% Contada	Média	Médiano
100.00	99.04	85.82

Ch5D12



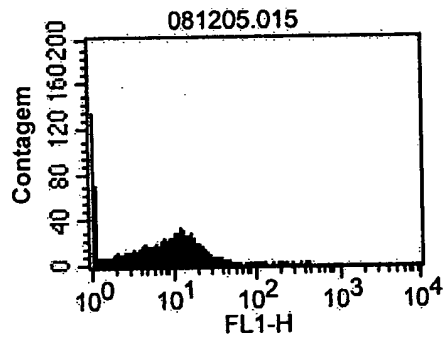
% Contada	Média	Mediano
100.00	102.97	88.96

DI5D12



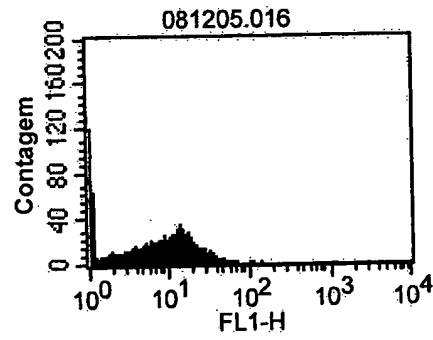
% Contada	Média	Mediano
100.00	50.44	47.40

Controle Mock



% Contada	Média	Mediano
100.00	11.25	8.74

Controle FACS



% Contada	Média	Mediano
100.00	10.18	8.74

Figura 9:

V-L-I variantes de DI5D12VH

1.	IV	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
2.	VI	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
3.	IL	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
4.	VV	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
5.	LL	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
6.	VL	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
7.	LV	1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
CH5D12 (PG100)		1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	NSA 62
DI5D12 (II)		1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
PG102 (LI)		1	QVKEQSSCPGLVKPSETLSLTETVSGESLRRYSVAIVROPPGKPEWMMNMGCGSTDS	STS 62
1.	IV	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
2.	VI	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
3.	IL	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
4.	VV	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
5.	LL	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
6.	VL	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
7.	LV	63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
CH5D12 (PG102)		63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
DI5D12 (II)		63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113
PG102 (LI)		63	LRSPRTSKQTSKSOVSERKMSLRITDDTAMVYCVRTDGDVWCGCTTVTVSS	113

Figura 10

Distribuição da produtividade de linhas celulares de GS-CHO que produzem o anticorpo PG102 e 'superdesenvolvimento' em culturas de placas de 24 reservatórios

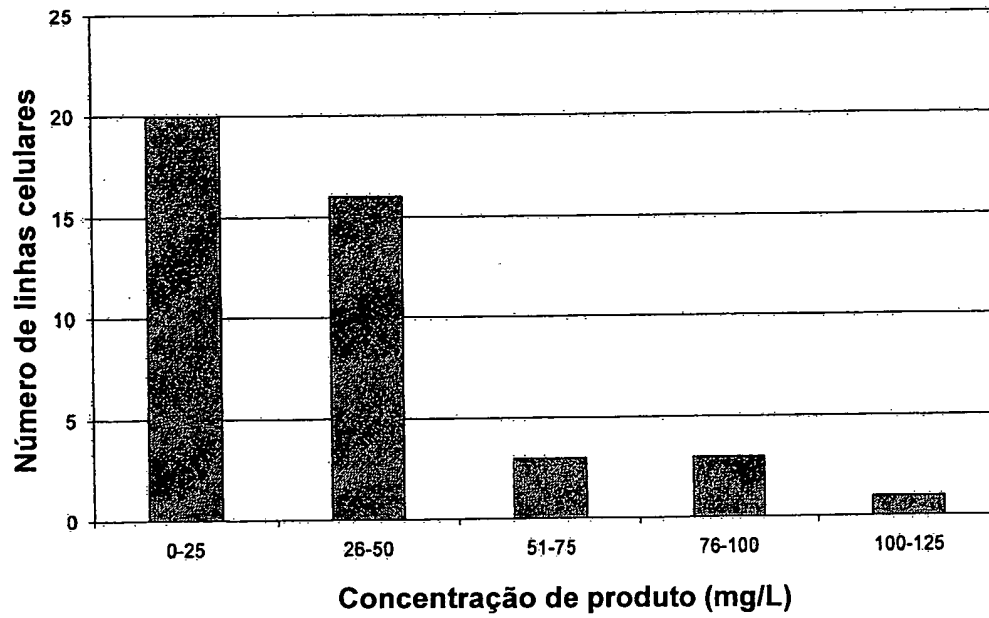


Figura 11:

Perfis de desenvolvimento e de acúmulo de anticorpos para linhas celulares L107 (DC1; painel superior), L25 (DC2; painel mediano) e M95 (DC3; painel inferior) em frascos de cultura de agitação de batelada alimentada com CDACF

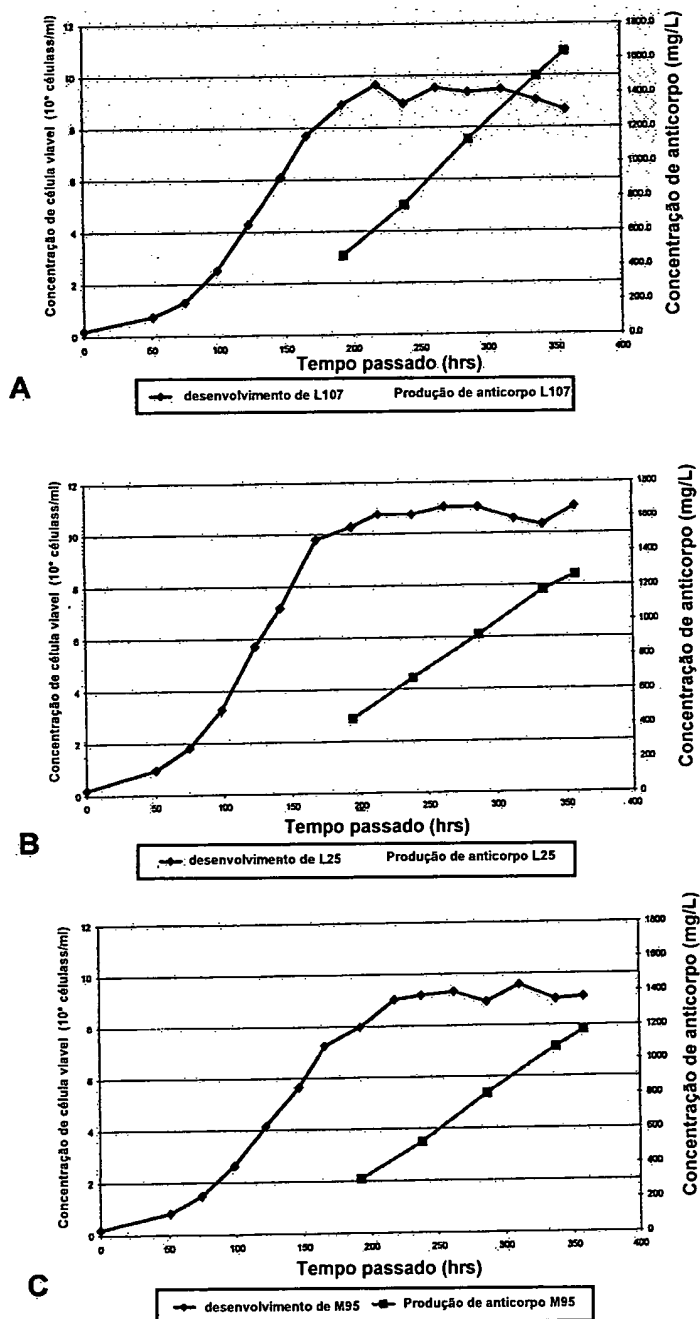
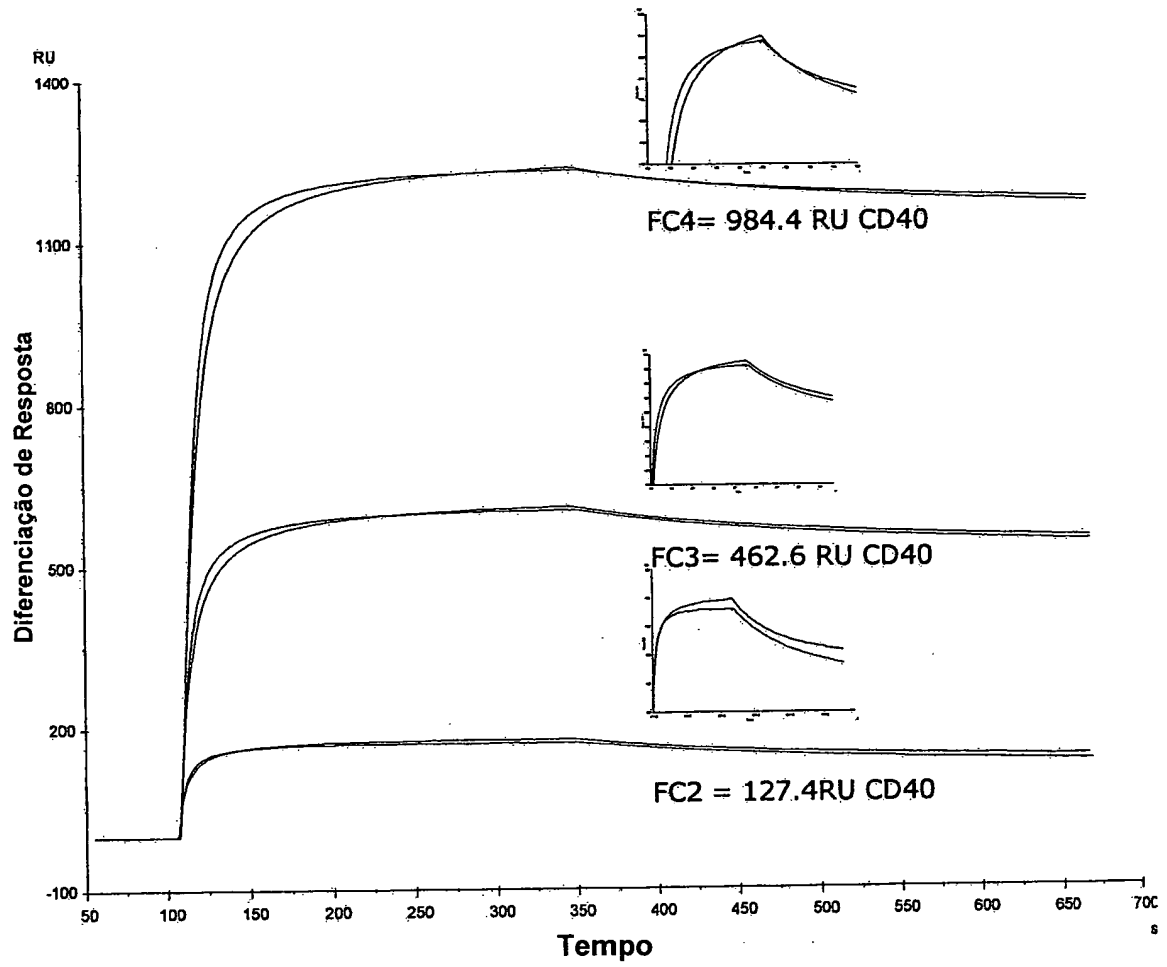


Figura 12:

Comparação da ligação de PG102(vermelho) e PG100(azul) em 10 pg/mL a CD40 imobilizado em 3 níveis diferentes



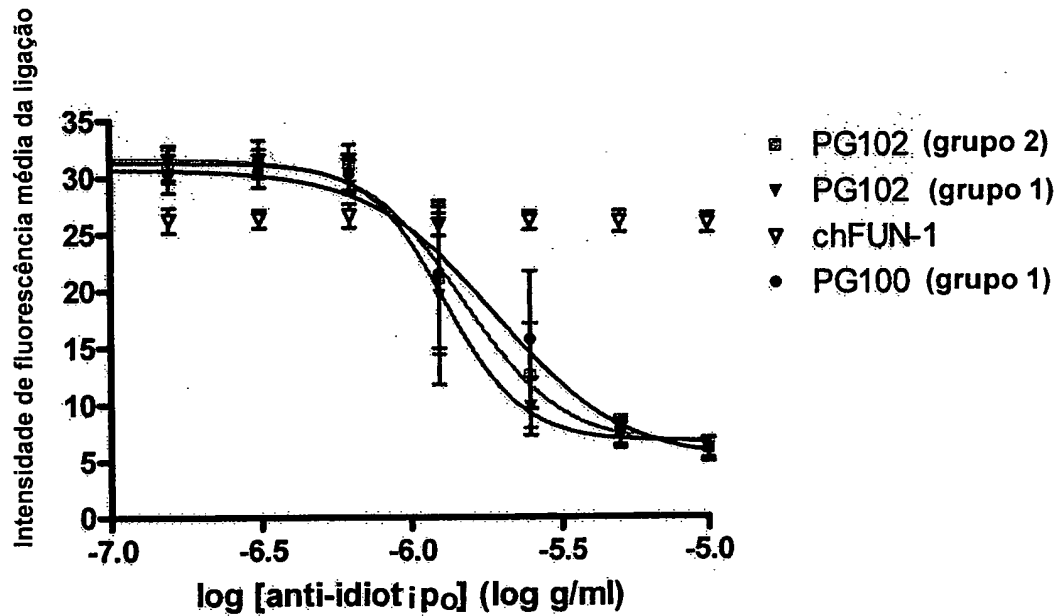


Figura 13:

Inibição de CD40 mAb às célula JY que expressam CD40 humano pelo mAb 173-36-1 anti-idiotipo. Os mAbs Anti-CD40 foram submetidos a ensaio em uma concentração de 1 $\mu\text{g/ml}$. Os dados indicam média \pm s.e. média de 4 determinações separadas para cada anticorpo.

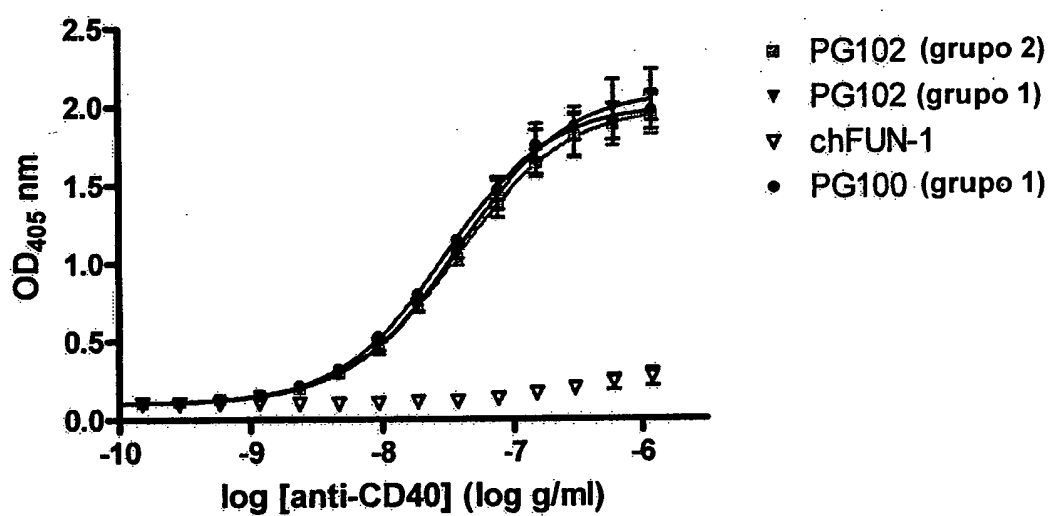


Figura 14:

CD40-Fc ELISA. A ligação relacionada com a concentração de PG100 e PG102 ao CD40-Fc humano. As placas foram revestidas durante a noite com 250 ng/ml de CD40-Fc humano. O mAB de controle de isotipo, chFUN-1, está direcionado contra o CD86 humano. Os dados indicam média \pm s.e. médio (todos $n = 3$).

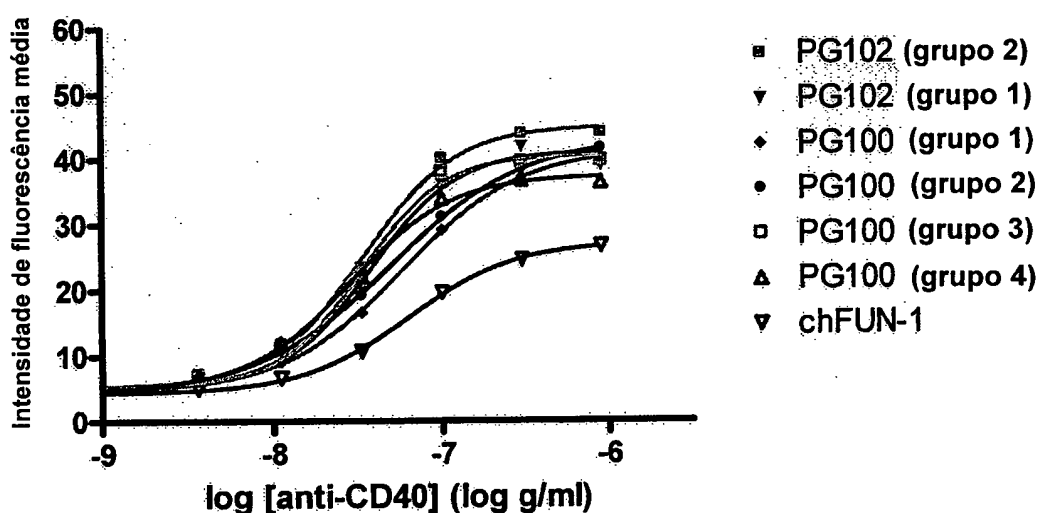


Figura 15

Quantificação de FAGS de mAB anti-CD40 que liga-se às células JY. PG100 e PG102 apresentaram concentrações de ligação média-máxima comparável. O anti-CD86 mAb, chFUN-1, também mostrou ligação às células JY nestes experimentos devido à expressão de superfície de CD86 humano por esta linha celular. Os dados indicam a média de determinações duplicadas para cada anticorpo.

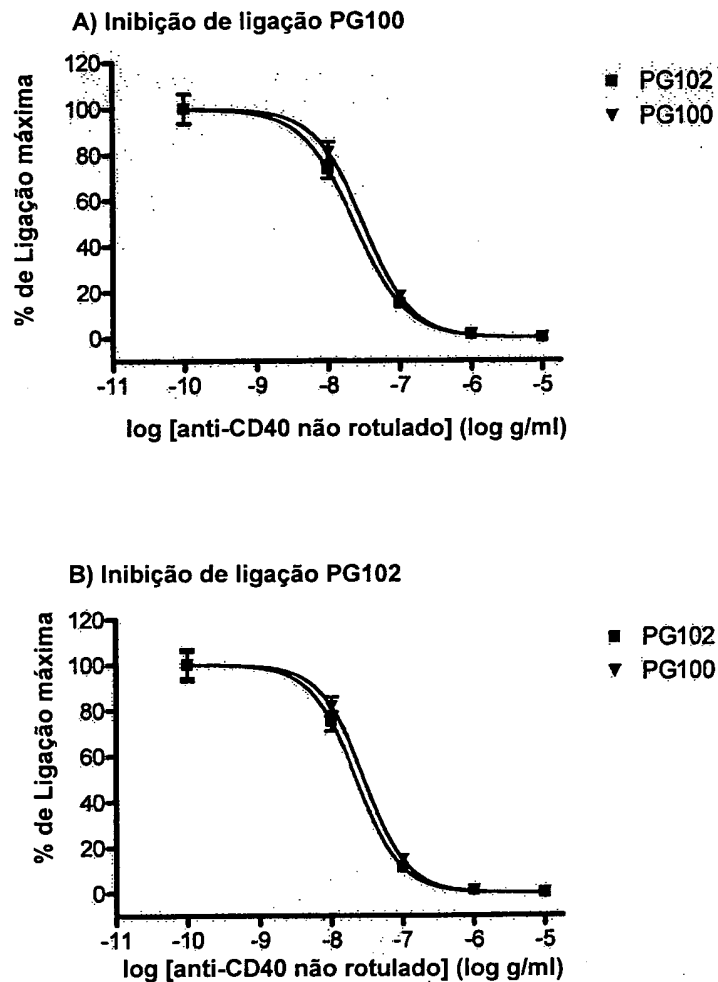


Figura 16

Inibição da ligação de PG102 - Inibição de ligação de PG100PE e PG102PE às células JY pelos anticorpos PG100 e PG102 rotulados. O PG100 (A) e o PG102 (B) rotulados foram incubados em $1 \mu\text{g/ml}$ na presença de aumento de concentração de anticorpo não rotulado de competição. O anticorpo rotulado foi determinado como a intensidade de fluorescência média (MFI) pela citometria de fluxo. O MFI máximo para a cinomolgoligação de PG100PE e PG102PE foi de 369 unidade de fluorescência (A) e 305 unidades de fluorescência (B), respectivamente. Os dados indicam média \pm s.e. médio de 4 experimentos separados.

Figura 17

Inibição da liberação de IL-8 pelas células THP-1 após a co-cultura com células Jurkat

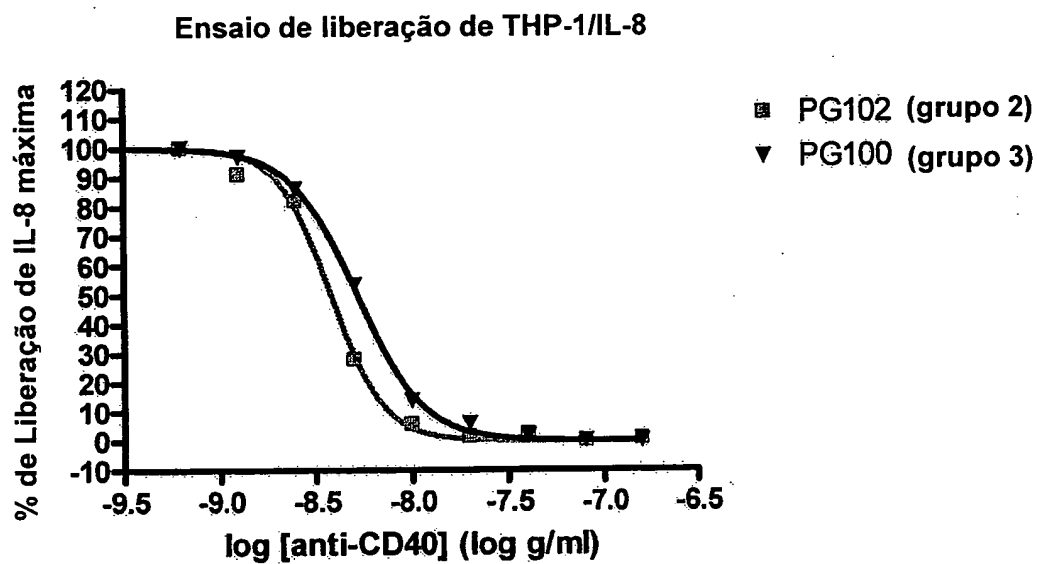


Figura 18

Sequência de proteína de cadeia pesada e leve de PEG102

As sequências de sinal estão sublinhadas, as regiões variáveis estão em negrito

Cadeia pesada :

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSQVKLQESGPGLVKPS**ETLSITCTVSGFSLSRYSVIWIRQPPGKGPE**
WMGMMWGGGSTDYSTSLKSRLTISKDTSKSQVSLKMNSLRTDDTAMYYCVRTDGDYWGQGTTVTV
 SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL
 SLGK

Cadeia leve:

MSVPTQVLGLLLLLWLT**DARCELQLTQSPFLSLFVTLGQPASISCRSSQSLANSNGNTYLHWYLQRP**
GQSPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGGGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Sequências de DNA que codificam cadeias pesada e leve de PEG102

As sequências de sinal são indicadas como sublinhado, as regiões variáveis em negrito e os códons de interrupção em letras minúsculas

Cadeia pesada:

ATGCAGTGGTCTTGGGTGTTCCCTGTTCTTCCTGTCTGTGACAACAGGAGTGCACTCTCAGGTCAA
GCTGCAGGAGTCTGGACCAGGACTGGTGAAGCCATCTGAGACCCTGAGCATCACCTGTACAGTGA
GCGGCTTCAGCCTCTCTAGATACAGCGTGTACTGGATCAGACAGCCACCTGGAAAGGGACCAGAG
TGGATGGGAATGATGTGGGGAGGAGGATCTACAGACTACAGCACCAGCCTGAAGTCTAGACTGAC
CATCAGCAAGGACACCTCTAAGTCTCAGGTCTCCCTGAAGATGAACTCTCTGAGAACAGACGACA
CCGCCATGTACTACTGTGTGAGAACCGACGGAGATTATTGGGGACAGGGCACAACAGTGACAGTG
TCCTCTGCCTCTACAAAGGGACCATCTGTGTTTCCACTGGCCCCATGTTCTAGATCTACCAGCGA
GTCTACAGCTGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTTCCAGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGA
ATAGTGGAGCCCTGACATCTGGAGTGCACACATTTCCAGCTGTGCTGCAGTCTAGCGGACTGTAT
TCTCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCCATCTTCTTCTCTGGGCACCAAGACCTACACATGTAACGT
GGACCACAAGCCATCTAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGTCTAAGTACGGACCACCATGCC
CATCTTGTCCAGCTCCAGAGTTTCTGGGAGGACCTAGCGTGTCTTCTGTTCCCCCAAAGCCAAAG
GATACCCTGATGATCTCTAGAACCCAGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCAGGAGGA
TCCAGAGGTCCAGTTTAACTGGTACGTGGATGGAGTGGAGGTGCACAACGCTAAGACAAAGCCAA
GAGAGGAGCAGTTCAACAGCACATACAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTGTCATCAGGATTGG
CTGAACGGCAAGGAATACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCATCTTCTATCGAGAAAAC
CATCTCTAAGGCTAAGGGACAGCCAAGGGAGCCACAGGTGTACACACTGCCACCATCTCAAGAGG
AGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTGAAGGGATTCTACCCATCTGATATCGCT
GTGGAGTGGGAGTCTAATGGACAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACACCACAGTGCTGGATTCT
TGACGGCTCTTTCTTCTGTACAGCAGACTGACAGTGGACAAGTCTAGATGGCAGGAGGGAAACG
TCTTTAGCTGTAGCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCTCTGTCTCTG
AGTCTGGGAAAAtgatag

Cadeia leve:

ATGTCTGTGCCAACACAGGTGCTGGGACTGCTGCTGCTGTGGCTGACAGATGCTAGATGTGAGCT
GCAGCTGACACAGTCTCCACTGTCTCTGCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTAGCATCAGCTGTA
GAAGCTCTCAGTCTCTGGCCAACTCTAACGGCAACACATACCTGCATTGGTATCTGCAGAGACCA
GGACAGTCTCCAAGACTGCTGATCTACAAGGTGTCCAACAGATTCTCTGGAGTGCCAGACAGATT
TTCTGGCTCTGGCTCTGGAACAGACTTCACCCCTGAAGATCTCTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGG
GAGTGTACTACTGCTCTCAGTCTACACATGTGCCATGGACATTCTGGAGGAGGAACAAAGCTGGAG
ATCAAGAGAACAGTGGCTGCCCCATCTGTGTTTATCTTCCCCCATCTGATGAGCAGCTGAAGTC
TGGAACAGCTTCTGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTCTACCCAAGGGAGGCTAAGGTGCAGTGGA
AGGTGGACAATGCTCTGCAGTCTGGAACTCTCAGGAGTCTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
TCTACCTACTCTCTGAGCAGCACACTGACACTGTCTAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTA
CGCCTGTGAGGTGACACATCAGGGACTGTCTAGCCCAGTGACCAAGTCTTTCAACAGAGGCGAGT
GCTgatag

RESUMO

“POLIPEPTÍDEO, CORPO DE LIGAÇÃO, ANTICORPO, ÁCIDO NUCLEICO, CÉLULA, CULTURA DE CÉLULA, MÉTODO PARA PRODUZIR UM ANTICORPO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO
5 DE UM POLIPEPTÍDEO, UM CORPO DE LIGAÇÃO, UM ANTICORPO, UM ÁCIDO NUCLEICO E/OU UMA CÉLULA, E, MÉTODOS PARA MUNIR UM INDIVÍDUO COM UM ANTICORPO E PARA SELECIONAR UM ANTICORPO ANTAGONISTA DE CD40 ANTI-HUMANO”

10 A presente invenção fornece novos anticorpos monoclonais CD40 anti-humano antagonísticos, métodos para gerá-los e seus usos.
