



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112012026227-0 A2



(22) Data do Depósito: 13/04/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 04/08/2020

(54) **Título:** ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO OU HUMANIZADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, COMPOSIÇÃO, E, USOS DE UM ANTICORPO

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/28; A61K 39/395; A61P 35/00; A61P 37/02; C07K 14/705; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 04/04/2011 US 61/471459; 13/04/2010 US 61/323720.

(71) **Depositante(es):** CELLDEX THERAPEUTICS, INC..

(72) **Inventor(es):** TIBOR KELER; HENRY C. MARSH; LIZHEN HE; LAURA A. VITALE; LAWRENCE J. THOMAS.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2011032355 de 13/04/2011

(87) **Publicação PCT:** WO 2011/130434 de 20/10/2011

(85) **Data da Fase Nacional:** 11/10/2012

(57) **Resumo:** ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO OU HUMANIZADO ISOLADO QUE SE LIGA A CD27 HUMANA, MOLÉCULAS BIESPECÍFICA, ANTICORPO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, COMPOSIÇÃO, E, MÉTODOS PARA INDUZIR OU INTENSIFICAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UM ANTÍGENO EM UM SUJEITO, PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS QUE EXPRESSAM CD27, QUE INIBE A LIGAÇÃO DE CD70 A CD27 EM CÉLULAS EM UM SUJEITO TENDO UM DISTÚRBIO, DE REGULAGEM NEGATIVA DE UMA RESPOSTA DE CÉLULA T EM UM INDIVÍDUO TENDO UM DISTÚRBIO, PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CD27 TEM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, PARA INTENSIFICAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UM ANTÍGENO EM UM SUJEITO EM NECESSIDADE DO MESMO. Anticorpos monoclonais isolados que se ligam ao CD27 humana e composições e moléculas com base em anticorpos relacionadas são divulgados. Ainda são divulgados métodos terapêuticos e de diagnósticos para usar anticorpos.

Análise Biacore de mAbsCD27 Humanos

Clone	Tempo de resposta (s)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU) Fc2-1	Rmax(RU) Fc4-3	KA (1/M)	KD(M)
1G5	480	2.23E+05	8.98E-05	236	177	2.55E+09	4.02E-10
1H8	480	2.18E+05	3.44E-05	313	226	6.39E+09	1.58E-10
3H12	480	1.74E+05	6.23E-05	298	205	2.80E+09	3.58E-10
3H8	1200	1.12E+05	6.19E-06	126	96	1.81E+10	5.56E-11
2G9	1200	1.74E+05	2.65E-07	97	75	6.60E+11	1.53E-12
1F5	480	3.07E+05	5.72E-05	312	206	5.37E+09	1.86E-10
3A10	480	1.74E+06	3.51E-04	113	79	4.97E+09	2.02E-10
2C2	480	5.03E+05	4.23E-05	54	40	1.20E+10	8.41E-11

“ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO OU HUMANIZADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, COMPOSIÇÃO, E, USOS DE UM ANTICORPO.”

Fundamento da invenção

5 Interações entre as células T e células apresentadoras de antígeno envolvem uma variedade de moléculas acessórias que facilitam a geração de uma resposta imune. Uma dita molécula é CD27, que liga CD70 e pertence à superfamília de receptores (TNF-R) de fator de necrose tumoral (Ranheim EA, et al., *Blood*. 15 de Junho de 1995; 85(12):3556-65). CD27
10 normalmente existe como uma proteína transmembrana tipo I glicosilada, frequentemente sob a forma de homodímeros com uma ponte dissulfeto, ligando os dois monômeros. A ponte dissulfeto é do domínio extracelular perto da membrana (Camerini et al., *J Immunol*. 147:3165-69 (1991). CD27 pode ainda ser expressa em uma forma solúvel (ver, por exemplo, van Oers
15 MH, et al., *Blood*. 1993 Dez.1; 82(11): 3430-6 and Loenen WA, et al., *Eur. J. Immunol*. 22:447, 1992). A ligação cruzada de antígeno CD27 a células T fornece um sinal de coestimulação que, em conjunto com ligação cruzada de receptor de células T, pode induzir a proliferação celular e a ativação imune

Segue a página 2

de células T.

CD27 é expressa em timócitos maduros, na maioria das células T sanguíneas periféricas CD4+ e CD8+, células natural killers e as células B (Kobata T, et al., *Proc. Natl. Acad. Scie. U S A.* 1995 Nov 21; 92(24):11249-53). CD27 é também altamente expressa em linfomas de células B não-Hodgkin e leucemias linfocíticas crônicas de células B (Ranheim EA, et al., *Blood.* 1995 Jun 15;85(12):3556-65). Além disso, aumento dos níveis de proteína solúvel CD27 foi identificado no soro ou locais de atividade da doença em infecções parasitárias, infecção por citomegalovírus (CMV), sarcoidose, esclerose múltipla e leucemia linfocítica crônica de célula B (Loenen WA, et al., *Eur. J. Immunol.* 22:447, 1992).

Anticorpos monoclonais agonistas contra CD27 recentemente demonstraram promover respostas de células T e mostram a promessa como terapêutica anti-câncer (ver, por exemplo, Sakanishi T, et al., *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2010 Feb 18 e WO 2008/051424). No entanto, enquanto os resultados obtidos até agora estabeleceram CD27 como um alvo útil para a imunoterapia, é desconhecido que características particulares dos anticorpos monoclonais anti-CD27 são especialmente vantajosas para fins terapêuticos. Como tal, há uma necessidade na técnica para mais insight sobre as propriedades funcionais específicas que geram anticorpos anti-CD27 terapeuticamente eficazes, bem como a melhores anticorpos terapêuticos contra CD27 que são mais eficazes para tratar ou prevenir doenças.

Sumário da invenção

A presente invenção fornece, entre outros, anticorpos anti-CD27 isolados, contendo propriedades funcionais particulares que podem estar relacionadas com os efeitos terapêuticos desejáveis e vantajosos. Especificamente, os anticorpos monoclonais anti-CD27 capazes de regulação para cima de célula T mediada por respostas imunes (por exemplo, como evidenciado por indução ou melhora de respostas de célula T específicas para

antígeno), que são particularmente bem adaptadas para a combinação com terapias de vacina, foram gerados e caracterizados por meio da presente invenção. Em uma modalidade, os anticorpos agonistas anti-CD27 podem melhorar a resposta imune contra cânceres ou doenças infecciosas por combinação com vacinação ativa, ou melhorando a resposta imune endógena. Ditos anticorpos podem ainda diretamente ou indiretamente induzir a expressão de citocinas. Além disso, os anticorpos anti-CD27 que regulam para baixo as respostas imunes mediadas por células T, que são particularmente adequadas para o tratamento de distúrbios imunológicos, como a rejeição do enxerto, alergia e doenças autoimunes, foram gerados e caracterizados. Ainda, anticorpos anti-CD27 que inibem o crescimento de células que expressam CD27 por mecanismos de morte de célula direta (por exemplo, citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) e/ou citotoxicidade celular dependente de complemento (CDCC)), que são particularmente efetivo no tratamento de uma variedade de doenças que envolvem a proliferação celular (por exemplo, cânceres), foram gerados e caracterizados.

Em uma modalidade, os anticorpos anti-CD27 da presente invenção apresentam uma ou mais das seguintes propriedades:

(a) bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 em pelo menos cerca de 70% em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml;

(b) liga a CD27 humano com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10^{-9} M ou menos, ou alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10^{+9} M⁻¹ ou mais;

(c) induz citotoxicidade mediada por complemento específico (CDC) de células que expressam CD27 de pelo menos 10% em uma concentração de anticorpo de 3 µg/ml e aproximadamente 6% complemento sérico de coelho;

(d) induz citotoxicidade mediada por célula dependente de

anticorpo (ADCC) lise específica de células que expressam CD27 de pelo menos 10% em uma concentração de anticorpo de 3 µg/ml e proporção de efector: células alvo de 75:1;

- 5 (e) melhora sobrevivência média em pelo menos 20% em imunodeficiência combinada grave (SCID) em camundongos após inoculação de célula de tumor in vivo (5×10^5 células Raji ou 1×10^6 células Daudi) quando administrado a 0,3mg (i.p.) pelo menos duas vezes por semana por 3 semanas comparado a camundongos aos quais o anticorpo não é administrado;
- 10 (f) induz ou aumenta respostas imunes específicas de antígeno em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;
- (g) induz ou aumenta respostas imunes TH1 específicas de antígeno em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;
- 15 (h) induz ou aumenta proliferação ou ativação de célula T específica de antígeno em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;
- (i) reduz ou inibe proliferação ou ativação de célula T;
- (j) induz ou aumenta a atividade de célula T quando combinado com ativação de TCR simultânea, separada ou sequencial;
- 20 (k) bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 em pelo menos cerca de 70% em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml e reduz ou inibe a ativação de célula T quando não é capaz de se ligar a, ou contendo ligação reduzida a receptores Fc;
- (l) resulta em menos do que 50% de esgotamento de células T CD3+ (além de células NK) em macacos quando administrado a 3 mg/kg (i.v.) pelo período de 29 dias imediatamente após a administração; ou
- 25 (m) resulta em menos do que 50% de esgotamento de células B de memória em macacos quando administrados a 3 mg/kg (i.v.) pelo período de 29 dias imediatamente após a administração.

Em uma modalidade particular, os anticorpos da invenção apresentam combinações dessas propriedades funcionais.

Assim, em um aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-CD27 que induzem e/ou reforçam uma resposta imune (por exemplo, uma resposta imune mediada por célula T). Em outra modalidade, os anticorpos inibem a ligação do CD70 a CD27 nas células. Anticorpos específicos contendo estas combinações de propriedades incluem mAb 1F5 compreendendo sequências de regiões variáveis pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 37 e/ou 43, respectivamente). Como alternativa, os anticorpos não inibem a ligação do CD70 a CD27 nas células. Anticorpos específicos contendo estas combinações de propriedades incluem mAb 3H8 compreendendo sequências de regiões variáveis pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 7 e/ou 13, respectivamente, ou 7 e/ou 19, respectivamente). Ditos anticorpos anti-CD27 também podem ser ligados a uma segunda molécula (por exemplo, como uma molécula biespecífica), contendo uma especificidade de ligação que é diferente de anticorpos, como um receptor de células T (por exemplo, CD3, CD25, CD137, CD154_L), ou um receptor Fc (por exemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB1 (CD32), FcγRIIB2 (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR e FcRn), ou um receptor NK (por exemplo CD56), ou um receptor de célula B (por exemplo CD19, CD20).

Anticorpos destinados a ser utilizados para indução ou melhora das respostas imunes de acordo com a presente invenção podem ter um domínio Fc funcional, permitindo a ligação a receptores Fc e podem incluir um domínio Fc mutante, com aumento dos níveis de ligação a receptores de Fc.

Em outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-CD27 que regulam para baixo as respostas imunes mediadas por células T inibindo a ligação do CD27 a CD70 em células que expressam estas proteínas. Em uma

modalidade particular, os anticorpos inibem a ligação de CD70 solúvel (sCD70) para células que expressam CD27 pelo menos cerca de 70%. Anticorpos específicos dentro desta classe incluem, por exemplo, mAb compreendendo sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 37 e/ou 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 49 e/ou 55 (mAb 1H8), SEQ ID NOs: 103 e/ou 109 (mAb 3 H 12).

Ainda outro aspecto, a invenção fornece anticorpos anti-CD27 que induzem ou melhoram a função de célula efetora (por exemplo, a célula matando via ADCC e/ou CDC). Em uma modalidade, o anticorpo induz, pelo menos cerca de 30% de lise específica de CD27 expressando as células através do ADCC em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml e/ou induz, pelo menos cerca de 30% CDC de células expressando CD27 em uma concentração de 10 µg/ml. Anticorpos específicos dentro desta classe apresentando função efetora ADCC incluem, por exemplo, (por exemplo, mAb) compreendendo sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 61 e/ou 67 (mAb 1G5), SEQ ID NOs: 85 e/ou 91, 85 e/ou 97 (mAb 3A10), SEQ ID NOs: 37 e/ou 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 7 e/ou 13, 7 e/ou 19 (mAb 3H8), SEQ ID NOs: 49 e/ou 55 (mAb 1H8), ou SEQ ID NOs: 103 e/ou 109 (mAb 3 H 12). Em outra modalidade, os anticorpos também inibem a ligação do CD70 a CD27 nas células. Anticorpos específicos contendo estas combinações de funções incluem, por exemplo, (por exemplo, mAb compreendendo sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 37 e/ou 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 49 e/ou 55 (mAb 1H8), SEQ ID NOs: 103 e/ou 109 (mAb 3H12). Como alternativa, o anticorpo induz ADCC e/ou CDC como descrito acima, mas não inibe a ligação do CD70 a CD27 nas células. Anticorpos específicos contendo estas características incluem, por exemplo, mAb compreendendo sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 61 e/ou 67 (mAb 1G5), SEQ ID NOs: 85 e/ou 91, 85 e/ou 97

(mAb 3A10), SEQ ID NOs: 7 e/ou 13, 7 e/ou 19 (mAb 3H8).

Anticorpos anti-CD27 capazes de induzir ou melhorar a função de célula efetora (por exemplo, ADCC e/ou CDC) também podem ser construídos para incluir uma região Fc que adequadamente contribui uma especificidade de ligação para um receptor específico de Fc (por exemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB1 (CD32), FcγRIIB2 (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR e FcRn).

Em outra modalidade é fornecido um método para melhorar uma resposta imune contra um antígeno em um indivíduo em necessidade de administração do indivíduo: i) um anticorpo humano ou humanizado anti-CD27 e ii) um antígeno, em que o anticorpo anti-CD27 é administrado separadamente de e antes do antígeno ser administrado.

Tipicamente em dito método o anticorpo anti-CD27 pode ser administrado entre pelo menos 2 e 96 horas antes do antígeno. Por exemplo, em dito método, o anticorpo anti-CD27 pode ser administrado pelo menos 2 horas antes do antígeno, por exemplo, pelo menos 12 horas antes do antígeno, devidamente pelo menos 24 horas antes do antígeno, pelo menos, 48 horas antes do antígeno ou pelo menos 72 horas antes do antígeno em que o agonista TLR é um agonista TLR3.

Em outra modalidade é fornecido um método para melhorar uma resposta imune contra um antígeno em um indivíduo em necessidade do mesmo por simultaneamente, separadamente ou sequencialmente administração ao indivíduo: i) um anticorpo anti-CD27; ii) um agonista TLR; e iii) opcionalmente, o antígeno.

Em uma modalidade preferencial de dito um método o agonista é um agonista TLR é um agonista TLR3, por exemplo, entre outros, Poly IC:LC.

As células que expressam CD27 incluem qualquer e todas as

células que expressam CD27, incluindo, entre outras, células B, células NK e células T. Em uma modalidade particular, as células que expressam CD27 incluem as linhagens celulares de câncer, como células de Jurkat, células Raji, células de Ramos e células Daudi. Em outra modalidade, as células que expressam CD27 são as células de tumor ou células cancerígenas. Em outra modalidade, as células que expressam CD27 incluem células B, células NK e células T incluindo células T que são encontrados em tumores infiltrantes, também chamado de linfócitos infiltrantes de tumor.

Os anticorpos específicos da presente invenção compreendem as regiões variáveis de cadeia pesada e leve que utilizam determinadas linhagens germinativas humanas, ou seja, são codificadas pelos genes da linhagem germinativa, mas incluem rearranjos genéticos e mutações, por exemplo, as mutações somáticas que ocorrem durante a maturação dos anticorpos. Em uma modalidade, a região variável da cadeia pesada dos anticorpos da presente invenção é derivada de um gene de linhagem germinativa humana 3-7 ou 3-33. Em outra modalidade, a região variável da cadeia leve do anticorpo é derivada de um gene de linhagem germinativa humana 3-20, 3-11, 24, 1D-16, 1-13. Em uma modalidade particular, a região variável da cadeia pesada do anticorpo é derivada de um gene de linhagem germinativa V_H 3-7 ou V_H 3-33 e a região variável da cadeia leve do anticorpo é derivada de um gene de linhagem germinativa humana V_K 3-20, V_K 3-11, V_K 1D-16, ou V_K 1-13.

Uma sequência de linhagem germinativa V_H 3-33 é fornecida (N.º de Acesso de Banco de Gene AAP44382) como a seguir:

1 vqlvesgggv vqpgrslrls caasgftfst ygmhwvrqap gkglewvaih wfdgsntyya
61 dsrgrftis rdssrktlyl emkslrvedt avyyca (SEQ ID NO: 3)

Uma sequência de linhagem germinativa V_H 3-7 é fornecida (N.º de Acesso de Banco de Gene AAP44389) como a seguir:

1 vqlvesgggl vqpgrslrls caasgftfsn symtwvrqap gkglewvahi kpdgsdknyi

61 nsrvgrftis rdnaekssyl qmnsraedt aiyycv (SEQ ID NO:4)

Em outra modalidade, a sequência da região variável da cadeia pesada CDR3 é selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 10, 28, 40, 52, 64, 76, 88, 106, e as modificações da sequência conservadoras das mesmas (por exemplo, substituições conservadoras de aminoácidos). Os anticorpos podem ainda incluir uma sequência de região variável de cadeia leve CDR3 selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 16, 22, 34, 46, 58, 70, 82, 94, 100, 112, e as modificações de sequência conservadoras das mesmas. Em outra modalidade, as sequências de cadeia pesada CDR2 e CDR1 são selecionadas a partir de SEQ ID NOs: 9, 27, 39, 51, 63, 75, 87, 105, e SEQ ID NOs: 8, 26, 38, 50, 62, 74, 86, 104, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas. As sequências de cadeia leve CDR2 e CDR1 são selecionadas de SEQ ID NOs: 15, 21, 33, 45, 57, 69, 81, 93, 99, 111, e SEQ ID NOs: 14, 20, 32, 44, 56, 68, 80, 92, 98, 110, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas.

Ainda em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo isolado que se liga a CD27 e inclui sequências de região variável de cadeia pesada e leve CDR1, CDR2 e CDR3 do grupo que consiste em:

- (i) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 38;
- uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 39;
- uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 40;
- uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 44;
- uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 45;

uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo
SEQ ID NO: 46; ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(ii) uma região variável de cadeia pesada CDR1
5 compreendendo SEQ ID NO: 50;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo
SEQ ID NO: 51;

uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo
SEQ ID NO: 52;

10 uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo
SEQ ID NO: 56;

uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo
SEQ ID NO: 57;

uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo
15 SEQ ID NO: 58; ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(iii) uma região variável de cadeia pesada CDR1
compreendendo SEQ ID NO: 104;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo
20 SEQ ID NO: 105;

uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo
SEQ ID NO: 106;

uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo
SEQ ID NO: 110;

25 uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo
SEQ ID NO: 111;

uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo
SEQ ID NO: 112; ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(iv) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 86;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 87;

5 uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 88;

uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 92 ou 98;

10 uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 93 ou 99;

uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 94 ou 100, ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas;

15 (v) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 26;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 27;

uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 28;

20 uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 32;

uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo SEQ ID NO: 33;

25 uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo SEQ ID NO: 34; ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(vi) uma região variável de cadeia pesada CDR1 compreendendo SEQ ID NO: 74;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo

SEQ ID NO: 75;

uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo

SEQ ID NO: 76;

uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo

5 SEQ ID NO: 80;

uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo

SEQ ID NO: 81;

uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo

SEQ ID NO: 82; ou

10 modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(vii) uma região variável de cadeia pesada CDR1
compreendendo SEQ ID NO: 8;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo

SEQ ID NO: 9;

15 uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo

SEQ ID NO: 10;

uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo

SEQ ID NO: 14 ou 20;

uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo

20 SEQ ID NO: 15 ou 21;

uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo

SEQ ID NO: 16 ou 22, ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas; e

(viii) uma região variável de cadeia pesada CDR1
25 compreendendo SEQ ID NO: 62;

uma região variável de cadeia pesada CDR2 compreendendo

SEQ ID NO: 63;

uma região variável de cadeia pesada CDR3 compreendendo

SEQ ID NO: 64;

uma região variável de cadeia leve CDR1 compreendendo
SEQ ID NO: 68;

uma região variável de cadeia leve CDR2 compreendendo
SEQ ID NO: 69;

5 uma região variável de cadeia leve CDR3 compreendendo
SEQ ID NO: 70; ou

modificações de sequência conservadoras das mesmas.

Em outra modalidade, a sequência de região variável da cadeia
pesada CDR3 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir
10 da sequência de consenso: R (G,E,D) (S,L,G,-) (G,L,T,W, -) (N,A,T,H,-)
(V,T,-) (M,P,-) (G,V,-) (R, -) (G,M, -) (D,H,L,T,W) (A,G,N,W) (D,F,V,Y)
(F,L) (D,E) (H,I,L,Y) (SEQ ID NO: 113), em que “-” denota a opção de
nenhum resíduo de aminoácido sendo presente na posição de consenso. Os
anticorpos podem ainda incluir uma sequência de região variável de cadeia
15 leve CD3 compreendendo uma sequência de aminoácido selecionada da
sequência de consenso: Q (F,R,Y) (N,S) (N,T,S) (Y,W) P (F,L,P,R) T (SEQ
ID NO: 114), em que “-” denota a opção de nenhum resíduo de aminoácido
sendo presente na posição de consenso. Em outra modalidade, a sequência de
região variável da cadeia pesada CDR2 compreende uma sequência de
20 aminoácidos selecionada a partir da sequência de consenso: I (K,W) (Y,N,Q)
D G S (E,N) (K,Q) (SEQ ID NO: 115), em que “-” denota a opção de nenhum
resíduo de aminoácido estando presente na posição consenso, e a sequência de
região variável de cadeia leve CDR2 compreende uma sequência de
aminoácido selecionada da sequência consenso: (A,D) A S (SEQ ID NO:
25 116). Em outra modalidade, a sequência de região variável da cadeia pesada
CDR1 compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir da
sequência de consenso: G F (T,S) (F,L) (S,N) (I,S,H) (Y,H) (SEQ ID NO:
117); e a sequência de região variável de cadeia leve CDR1 compreende uma
sequência de aminoácido selecionada da sequência consenso: Q (D,G,S) (I,V)

(D,S) (R,S) (A,W,Y) (SEQ ID NO: 118).

Em outra modalidade, anticorpos isolados da invenção se ligam a CD27 humano e incluem uma região variável de cadeia pesada incluindo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 7, 24, 25, 36, 37, 48, 49, 60, 61, 72, 73, 84, 85, 102, 103, e modificações de sequência conservadoras das mesmas. O anticorpo pode ainda incluir uma região variável de cadeia leve incluindo uma sequência de aminoácido selecionado do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 13, 18, 19, 30, 31, 42, 43, 54, 55, 66, 67, 78, 79, 90, 91, 96, 97, 108, 109, e modificações de sequência conservadoras das mesmas.

Ainda em outra modalidade, anticorpos isolados da invenção se ligam a CD27 humano e incluem uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve incluindo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs:

(a) SEQ ID NOs: 37 e/ou 43, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(b) SEQ ID NOs: 49 e/ou 55, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(c) SEQ ID NOs: 103 e/ou 109, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(d) SEQ ID NOs: 85 e/ou 91 e/ou 97, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(e) SEQ ID NOs: 25 e/ou 31, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(f) SEQ ID NOs: 73 e/ou 79, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas;

(g) SEQ ID NOs: 7 e/ou 13 e/ou 19, respectivamente, e modificações de sequência conservadoras das mesmas; e

(h) SEQ ID NOs: 61 e/ou 67, respectivamente, e modificações

de sequência conservadoras das mesmas;

Anticorpos isolados que incluem regiões variáveis de cadeia pesada e leve contendo pelo menos 80%, ou, pelo menos, 85%, ou, pelo menos, 90%, ou, pelo menos, 95%, ou, pelo menos, 96%, ou, pelo menos, 97%, ou, pelo menos, 98%, ou, pelo menos, 99%, ou mais de identidade de sequência com qualquer uma das sequências acima também estão incluídos na presente invenção. Intervalos intermediários dos valores acima mencionados, por exemplo, as regiões variáveis de cadeia pesada e leve com pelo menos 80-85%, 85-90%, 90-95% ou identidade de sequência de 95-100% com qualquer uma das sequências acima referidas são também pretendidos por estar incluídos pela presente invenção.

Também englobados pela presente invenção são os anticorpos isolados que competem para a ligação a CD27 com os anticorpos da presente invenção. Em uma modalidade particular, o anticorpo compete para a ligação a CD27 com um anticorpo que compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 37 e 43, SEQ ID NOs: 49 e 55, SEQ ID NOs: 103 e 109, SEQ ID NOs: 85 e 91, SEQ ID NOs: 85 e 97, SEQ ID NOs: 25 e 31, SEQ ID NOs: 73 e 79, SEQ ID NOs: 7 e 13, SEQ ID NOs: 7 e 19, SEQ ID NOs: 61 a 67, respectivamente, ou sequências de aminoácidos de pelo menos 80% idêntica ao mesmo. Em outra modalidade, o anticorpo compete para a ligação a CD27 com um anticorpo que compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 37 e 43(1F5), SEQ ID NOs: 49 e 55 (1H8) ou SEQ ID NOs: 103 e 109 (3H12). Em outra modalidade, o anticorpo compete para a ligação a CD27 com um anticorpo que compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 25 e 31 (2C2), SEQ ID NOs: 7 e 13 (3H8), SEQ ID NOs: 7 e 19 (3H8), SEQ ID NOs: 61 a 67 (1G5) ou SEQ ID NOs: 73

e 79 (2G9). Ainda em outra modalidade, o anticorpo compete para a ligação a CD27 com um anticorpo que compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 85 e 91 (3A10) ou SEQ ID NOs: 85 e 97 (3A10).

5 Outros anticorpos da invenção se ligam a um epítopo em CD27 reconhecido pelos anticorpos aqui descritos. Em outra modalidade particular, o anticorpo se liga a epítopo em CD27 reconhecido por um anticorpo que compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID

10 NOs: 37 e 43, SEQ ID NOs: 49 e 55, SEQ ID NOs: 103 e 109, SEQ ID NOs: 85 e 91, SEQ ID NOs: 85 e 97, SEQ ID NOs: 25 e 31, SEQ ID NOs: 73 e 79, SEQ ID NOs: 7 e 13, SEQ ID NOs: 7 e 19, SEQ ID NOs: 61 a 67, respectivamente, ou sequências de aminoácidos de pelo menos 80% idêntica ao mesmo. Em outra modalidade, o anticorpo se liga a epítopo em CD27

15 reconhecido por um anticorpo que compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 37 e 43 (1F5), SEQ ID NOs: 49 e 55 (1H8) ou SEQ ID NOs: 103 e 109 (3H12). Em outra modalidade, o anticorpo se liga a epítopo em CD27 reconhecido por um anticorpo que compreende regiões variáveis de

20 cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 25 e 31 (2C2), SEQ ID NOs: 7 e 13 (3H8), SEQ ID NOs: 7 e 19 (3H8), SEQ ID NOs: 61 a 67 (1G5) ou SEQ ID NOs: 73 e 79 (2G9). Ainda em outra modalidade, o anticorpo se liga a epítopo em CD27 reconhecido por um anticorpo que compreende regiões variáveis de

25 cadeia pesada e/ou leve compreendendo as sequências de aminoácidos estabelecidas nas SEQ ID NOs: 85 e 91 (3A10) ou SEQ ID NOs: 85 e 97 (3A10).

Os anticorpos da invenção podem ser de comprimento total, por exemplo, qualquer um dos isotipos seguintes: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,

IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, e IgE. Alternativamente, os anticorpos podem ser fragmentos como uma porção de ligação ao antígeno ou um anticorpo de cadeia simples (por exemplo, um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv, um fragmento Fv de cadeia simples, uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas). Os anticorpos
5 podem ser qualquer tipo de anticorpo, incluindo, entre outros, anticorpos humanos, humanizados, e quiméricos.

Antígenos tumorais empregados pela presente invenção (por exemplo, em uma vacina, usados em combinação com um anticorpo anti-
10 CD27 da invenção) inclui qualquer antígeno ou determinante que está presente em (ou associado com) uma célula de tumor e não tipicamente em células normais, ou um antígeno ou determinante antigênico que está presente em ou associado com células de tumor em quantidades maiores do que células normais (não tumorais), ou um antígeno ou determinante antigênico que está
15 presente em células de tumor em uma forma diferente daquela encontrada em células normais (não tumorais). Ditos antígenos incluem antígenos específicos de tumor, incluindo antígenos de membrana específicos para tumor, antígenos associados a tumor, incluindo antígenos de membrana associados a tumor, antígenos embrionários em tumores, receptores de fator de crescimento,
20 ligantes de fator de crescimento e qualquer tipo de antígeno que está associado com câncer. Um antígeno de tumor pode ser, por exemplo, um antígeno de câncer epitelial (por exemplo, mama, gastrointestinal, pulmonar), um antígeno de câncer específico de próstata (PSA) ou antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), um antígeno de câncer de bexiga, a antígeno
25 de câncer pulmonar (por exemplo, pulmonar de célula pequena), um antígeno de câncer de cólon, um antígeno de câncer ovariano, um antígeno de câncer cerebral, um antígeno de câncer gástrico, um antígeno de carcinoma de célula renal, um antígeno de câncer pancreático, um antígeno de câncer hepático, um antígeno de câncer esofágico, um antígeno de câncer de cabeça e pescoço, ou

um antígeno de câncer colorretal. Por exemplo, o antígeno pode incluir um antígeno de tumor, como β hCG, gp100 ou Pmel17, CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiótipo, tirosinase, telomerase, SSX2, MUC-1, MAGE-A3, e do antígeno associado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) MART1, melan-A, EGFRvIII, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2, ou mesotelina. Outros antígenos utilizados na presente invenção (por exemplo, em uma vacina, utilizada em combinação com um anticorpo anti-CD27 da invenção) incluem antígenos de agentes patogênicos de doenças infecciosas, como vírus, bactérias, parasitas e fungos, exemplos dos quais são revelados aqui.

A invenção também fornece uma molécula biespecífica compreendendo um anticorpo da invenção ligado a uma segunda fração funcional, contendo uma especificidade de ligação diferente de dito anticorpo. Por exemplo, em uma modalidade, a segunda molécula pode ligar um receptor de células T (por exemplo, CD3, CD40).

As composições incluindo um anticorpo ou uma molécula biespecífica aqui descrito, formulado com um carreador farmacologicamente aceitável, também são fornecidas. As composições podem ainda incluir um adjuvante, agente imunoestimulatório (por exemplo, ligante CD40, ligante FLT 3, citocinas, fatores estimuladores de colônia, um anticorpo anti-CTLA-4, anticorpo anti-PD1, anticorpo anti-41BB, anticorpo anti OX-40, LPS (endotoxina), ssRNA, dsRNA, bacilo Calmette-Guerin (BCG), Levamisol cloridrato, imunoglobulinas intravenosas e um agonista de receptor tipo Toll (TLR) (por exemplo, agonista de TLR3 como Poly IC, um agonista TLR4, um agonista TLR5, um agonista TLR7, um agonista TLR8, e um agonista TLR 9)), agente imunossupressor, outro anticorpo ou um antígeno. Antígenos exemplares incluem, entre outros, um componente de um agente patogênico, um antígeno tumoral (por exemplo, β hCG, gp100 ou Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-

BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE -3, MAGE -A3, tirosinase, Telomerase, antígenos SSX2, antígenos MUC-1 e antígenos do tumor derivados de células germinativas), um antígeno de doença infecciosa (por exemplo, antígenos virais, bacterianos e parasitárias) um alérgeno, ou um autoantígeno. Qualquer um dos antígenos divulgados aqui pode ser incluído em uma composição da invenção.

Moléculas de ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da invenção são ainda incluídos pela invenção, bem como vetores de expressão compreendendo ditos ácidos nucleicos e células hospedeiras compreendendo ditos vetores de expressão. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo monoclonal isolado que se liga a CD27 humana, em que o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve codificadas por sequências de ácidos nucleicos selecionadas do grupo que consiste em: (a) SEQ ID NOs: 5 e 11, respectivamente; (b) SEQ ID NOs: 5 e 17, respectivamente; (c) SEQ ID NOs: 23 e 29, respectivamente; (d) SEQ ID NOs: 35 e 41, respectivamente; (e) SEQ ID NOs: 47 e 53, respectivamente; (f) SEQ ID NOs: 59 e 65, respectivamente; (g) SEQ ID NOs: 71 e 77, respectivamente; (h) SEQ ID NOs: 83 e 89, (i) SEQ ID NOs: 83 e 95; (j) SEQ ID NOs: 101 e 107, respectivamente ou sequências de ácido nucleico contendo pelo menos 90% de identidade às sequências de (a)-(h).

Em outra modalidade, a presente invenção fornece métodos para induzir ou melhorar uma resposta imune (por exemplo, uma resposta imune mediada por célula T, e/ou uma resposta mediada por NK e/ou resposta imune mediada por células B) contra um antígeno em um indivíduo pela administração de uma quantidade efetiva de um anticorpo (por exemplo, um anticorpo de comprimento total), composição ou molécula biespecífica aqui descritos. Ditos métodos são particularmente bem adaptados para uso em terapias de vacina.

Os anticorpos e outras composições da presente invenção também podem ser usados para inibir o crescimento de células que expressam CD27 entrando em contato com as células com um anticorpo ou composição de uma quantidade efetiva para inibir o crescimento de células que expressam CD27 (por exemplo, no tratamento de câncer). Anticorpos úteis em inibir o crescimento de células que expressam CD27 incluem anticorpos de comprimento total e fragmentos do mesmo, bem como anticorpos que contêm uma segunda especificidade de ligação para um receptor Fc. Em uma modalidade, as células que expressam CD27 são contatadas com um anticorpo na presença de células efectoras em condições suficientes para induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) de células alvo (por exemplo, o anticorpo induz pelo menos cerca de 40% lise específica de células que expressam CD27 em uma concentração de 10µg/ml e compreende SEQ ID NOs: 61, 67, 85, 91, 97, 37, e/ou 43). Em outra modalidade, as células são contatadas com um anticorpo em condições suficientes para induzir citotoxicidade mediada por complemento (CDC) das células (por exemplo, o anticorpo induz pelo menos cerca de 40% de citotoxicidade mediada por complemento (CDC) de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml e compreende SEQ ID NOs: 7, 13, 19, 49, 55, 103, e/ou 109).

Em outra modalidade, o anticorpo empregado para inibir o crescimento de células que expressam CD27 pode ainda possuir (ou ser desprovido de) características funcionais adicionais. Por exemplo, o anticorpo também pode inibir a ligação do CD70 a CD27 em células que expressam essas proteínas (por exemplo, um mAb compreendendo sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 37 e/ou 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 49 e/ou 55 (mAb 1H8), ou SEQ ID NOs: 103 e/ou 109 (mAb 3H12). Alternativa, o anticorpo pode não inibir a ligação do CD70 a CD27 em ditas células (por exemplo, um mAb

compreendendo sequências de regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo SEQ ID NOs: 61 e/ou 67 (mAb 1G5), SEQ ID NOs: 85 e/ou 91, 85 e/ou 97 (mAb 3A10), ou SEQ ID NOs: 7 e/ou 13, 7 e/ou 19 (mAb 3H8).

5 Células que expressam CD27 incluem qualquer e todas as células que expressam CD27, incluindo, entre outras, células B, células NK e células T. Em uma modalidade particular, as células que expressam CD27 incluem as linhagens celulares como células de Jurkat, células Raji, células de Ramos e células Daudi. Em outra modalidade, as células que expressam
10 CD27 são as células de tumor ou células cancerígenas. Em outra modalidade, as células que expressam CD27 incluem células B, células NK células T que são encontrados em tumores infiltrantes, também chamado de linfócitos infiltrantes de tumor.

Os métodos de inibição do crescimento de células que
15 expressam CD27 que estão descritas aqui podem ser usados para tratar e prevenir uma grande variedade de doenças e distúrbios. Por exemplo, em uma modalidade, os métodos podem ser usados para tratar ou prevenir um câncer (por exemplo, um câncer selecionado de grupo que consiste em leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia
20 monocítica promielocítica mieloblastos, leucemia crônica, leucemia mielocítica crônica (granulocítica), leucemia linfocítica crônica, linfoma de célula de manta, linfoma de sistema nervoso central primário, linfoma de Burkitt, linfoma de célula B de zona marginal, Policitemia vera Linfoma, doença de Hodgkin, doença não Hodgkin, mieloma múltiplo,
25 macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, tumores sólidos, sarcomas, e carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, crondrosarcoma, sarcoma osteogênico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing,

leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de cólon, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma de célula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma de duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de célula pequena, carcinoma pulmonar de célula não pequena, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngea, carcinoma esofágico, carcinoma de célula basal, câncer de trato biliar, câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de sistema nervoso central e cérebro (CNS), câncer cervical, coriocarcinoma, cânceres colorretal, câncer de tecido conectivo, câncer de sistema digestivo, câncer endometrial, câncer esofágico, câncer de olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, neoplasma intraepitelial, câncer renal, câncer de laringe, câncer hepático, câncer pulmonar (célula pequena, célula grande), melanoma, neuroblastoma; câncer da cavidade oral (por exemplo, lábio, língua, boca e faringe), câncer ovariano, câncer pancreático, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, câncer retal; câncer do sistema respiratório, sarcoma, câncer de pele, câncer de estômago, câncer testicular, câncer tireoide, câncer uterino, e câncer do sistema urinário).

Cânceres preferenciais incluem tumores que expressam CD27 selecionados do grupo que consiste em por leucemia linfocítica crônica, linfoma de células do manto, linfoma primário de sistema nervoso central, linfoma de Burkitt e linfoma de célula B de zona marginal. Em outra modalidade, os métodos podem ser usados para tratar ou prevenir uma infecção bacteriana, fúngica,

viral ou parasitária.

A presente invenção ainda fornece métodos para inibir a ligação de CD70 a CD27 nas células em um indivíduo contendo um distúrbio através da administração de anticorpos ao indivíduo ou composições conforme descrito aqui, bem como métodos para regulação para baixo de uma resposta de células T em um indivíduo contendo um distúrbio através da administração a um indivíduo de anticorpos ou composições aqui descritas. Esses métodos são ideais para uso no tratamento de distúrbios imunológicos, como rejeição de enxerto, doenças autoimunes e alergia. Anticorpos úteis nestes métodos incluem fragmentos Fab, bem como uma região de Fc mutante para que o anticorpo não se ligue, ou tenha a ligação significativamente reduzida a receptores Fc. Em uma modalidade particular, o anticorpo compreende regiões variáveis de cadeia pesada e/ou leve compreendendo as SEQ ID NOs: 37 e/ou 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 49 e/ou 55 (mAb 1H8), ou SEQ ID NOs: 103 e/ou 109 (mAb 3H12).

Os métodos descritos aqui para inibir a ligação do CD70 a CD27 nas células e para regulação para baixo de uma resposta de célula T podem ser usados para tratar uma ampla variedade de doenças e distúrbios, incluindo, entre outros, a rejeição do enxerto, alergia e doenças autoimunes. Em uma modalidade particular, a doença é uma doença autoimune (por exemplo, esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes tipo 1, psoríase, doença de Crohn e outras doenças intestinais inflamatórias como colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), encefalomielite autoimune, miastenia gravis (MG), tireoidite de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pênfigo, doença de Graves, anemia hemolítica autoimune, purpura trombocitopênica autoimune, escleroderma com anticorpos anti-colágeno, doença de tecido conectivo misto, polipiosite, anemia perniciosa, doença de Addison idiopática, infertilidade associada a autoimune, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescente, glomerulonefrite proliferativa, pênfigo bolhoso,

síndrome de Sjogren, artrite psoriática, resistência a insulina, diabetes mellitus autoimune, hepatite autoimune, hemofilia autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), hepatite autoimune, hemofilia autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune, uveoretinite autoimune, síndrome de Guillain-Barré, arteriosclerose e doença de Alzheimer).

A presente invenção ainda fornece para usos particulares anticorpos, composições e moléculas biespecíficas aqui descritas. Por exemplo, em uma modalidade, a invenção fornece o uso de um anticorpo, composição ou molécula biespecífica na produção de um medicamento para induzir ou melhorar uma resposta imune contra um antígeno em um indivíduo. Em outras modalidades, a invenção fornece para o uso de um anticorpo ou composição na produção de um medicamento para inibir o crescimento o crescimento de células que expressam CD27, o uso de um anticorpo ou composição na produção de um medicamento para inibir a ligação do CD70 a CD27 nas células em um indivíduo contendo um distúrbio e o uso de um anticorpo ou composição na produção de um medicamento para regular para baixo uma resposta de células T em um indivíduo contendo um distúrbio. A presente invenção ainda inclui um anticorpo, composição ou molécula biespecífica para uso em indução ou melhora de uma resposta imune contra um antígeno em um indivíduo, um anticorpo ou composição para uso na inibição do crescimento de células que expressam CD27, um anticorpo ou composição para uso em inibir a ligação do CD70 a CD27 nas células em um indivíduo contendo um distúrbio e um anticorpo ou composição para uso em regulação para baixo de uma resposta de células T em um indivíduo contendo um distúrbio.

A presente invenção também fornece métodos para detectar a presença ou ausência de CD27 em uma amostra biológica por (1) contactando uma amostra biológica com um anticorpo descrito aqui (onde o anticorpo é marcado com uma substância detectável) e (2) detectar o anticorpo ligado a

CD27.

Também no escopo da invenção estão kits compreendendo as composições (por exemplo, anticorpos e/ou moléculas biespecíficas) da invenção e, opcionalmente, instruções de uso. O kit ainda pode conter pelo menos um reagente adicional, como uma citocina ou complemento de um ou mais anticorpos adicionais da invenção.

Outras características e vantagens da invenção presente serão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada e reivindicações.

Breve Descrição dos Desenhos

A **Figura 1** descreve a afinidade e parâmetros cinéticos para mAbs 1G5, 1H8, 3H12, 3H8, 2G9, 1F5, 3A10, 2C2, ms 1A4, ms 9F4 e ms M-T271 como determinado por Biacore™ software BiaEvaluation (Biacore AB) com CD27 recombinante humano imobilizado no chip.

A **Figura 2** é um gráfico que mostra a ligação de anticorpos anti-CD27 humano (2C2, 3H8, 1F5, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10 e 3H12) para CD27 recombinante humana purificada usando ELISA.

A **Figura 3** é um gráfico mostrando a ligação por ELISA de 1F5 a CD27 purificado recombinante humano ou macaco (macaco).

A **Figura 4** é um gráfico mostrando o efeito de anticorpos anti-CD27 humana (2C2, 3H8, 1F5, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10 e 3H12) e MsIgG (1A4, 9F4 e M-T271) na ligação do CD70 solúvel (sCD70) a proteína CD27 (mostrada como % de bloqueio) por ELISA.

A **Figura 5** é uma análise de citometria de fluxo da ligação 1F5 a linhagens de células linfoblastoides humanas, e bloqueio da ligação a sCD70.

As **Figuras 6A-D** são gráficos que mostram a ligação de anticorpos anti-CD27 humanos (2C2, 3H8, e 1F5) a CD27 em células Jurkat (Figura 4A), células Raji (Figura 4B), célula Ramos (Figura 4C), e células Daudi (Figura 4D) como avaliado por citometria de fluxo.

A **Figura 7** é um gráfico que mostra a ligação de anticorpos anti-CD27 humanos (2C2, 3H8, 1F5, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10 e 3H12) a CD27 em células Daudi como avaliado por citometria de fluxo.

5 A **Figura 8** é um gráfico em barra mostrando os resultados de um experimento ELISA de bloqueio cruzado de anti-CD27, demonstrando que os anticorpos 1F5, 1H8 e 3H12 são capazes de bloqueio cruzado cada outro e assim, se ligam ao mesmo epítopo.

10 A **Figura 9** é um gráfico em barra mostrando os resultados de um experimento ELISA de bloqueio cruzado de anti-CD27, demonstrando que os anticorpos 2C2, 3H8, 1G5 e 2G9 são capazes de bloqueio cruzado cada outro e assim, se ligam ao mesmo epítopo.

15 A **Figura 10** é um gráfico em barra mostrando os resultados de um experimento ELISA de bloqueio cruzado a anti-CD27, demonstrando que a ligação de anticorpo 3A10 a CD27 não é totalmente bloqueio cruzado por qualquer um dos outros anticorpos anti-CD27 testados, assim, indicando que 3A10 se liga a um único epítopo, mas a ligação a 3A10 é parcialmente bloqueada cruzada por anticorpos 1F5, 1H8 e 3H12, indicando que o epítopo para 3A10 pode estar próximo ao epítopo ligado por anticorpos 1F5, 1H8 e 3H12.

20 A **Figura 11** é um gráfico que descreve os resultados de um ensaio de citotoxicidade celular dependente de complemento (CDCC) usando mAbs 1F5, 2C2, 3H8, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10 e 3H12.

25 A **Figura 12** é um gráfico que descreve os resultados de outro ensaio de citotoxicidade celular dependente de complemento (CDCC) usando mAb 1F5

A **Figura 13** é um gráfico que descreve os resultados de um ensaio de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) usando mAbs 2C2, 1F5, 3H8, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10, 3H12, Rituxan e HuIgG.

A **Figura 14** é um gráfico que descreve os resultados de outra citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) usando mAb 1F5

5 A **Figura 15** é um alinhamento de sequências VH de anticorpos anti-CD27 humanos (1F5, 1G5, 1H8, 2C2, 2G9, 3A10, 3H12 e 3H8).

A **Figura 16** é um alinhamento das sequências VL de anticorpos anti-CD27 humanos (1F5, 1G5, 1H8, 2C2, 2G9, 3A10, 3H12 e 3H8).

10 As **Figuras 17 e 18** mostram os resultados de um estudo in vivo em primata não humano usando mAb 1F5. Em particular, a Figura 17 mostra 1F5 em linfócitos circulantes após uma dose única. A Figura 18 mostra 1F5 não significativamente esgotado em linfócitos circulantes.

15 A **Figura 19** descreve o resultado de um ensaio de manchamento de pentâmero em células de sangue periféricas de camundongo e esplenócitos.

A **Figura 20** descreve os resultados de um ensaio ELISPOT e produção aumentada de IFN γ usando anticorpos anti-CD27.

20 A **Figura 21** mostra melhora por anti-CD27 mAbs de respostas de células T a um antígeno de vacina em um modelo de camundongo transgênico por manchamento de pentâmero e IFN ELISPOT.

25 As **Figuras 22A-C** são o protocolo para e resultados de um experimento que mostra que anti-CD27 melhora as respostas de célula T a uma vacina direcionada a APC (α -DEC205-OVA). A Figura 22A mostra o protocolo para o experimento. A Figura 22B mostra os resultados de um experimento de manchamento de tetrâmero para medir células T específicas de antígeno. A Figura 22C mostra os resultados de um ensaio IFN-gama ELISPOT para medir as células T específicas de antígeno.

As **Figuras 23A-D** são os resultados de um experimento que

mostra que anti-CD27 em combinação com o agonista TLR3 PolyIC (a 25 µg, 50 µg ou 100 µg) melhora as respostas de célula T a uma vacina direcionada a APC (α -DEC205-OVA). A Figura 23A é um gráfico que mostra o % de células positivas para IFN-gama entre células T CD8+ T para camundongos tipo selvagem tratados com poly IC e o anti-CD27 mAb 1F5, camundongo transgênico huCD27 com poly IC e um anticorpo IgG1 humano controle ou camundongo transgênico huCD27 tratado com poli IC e o anti-CD27 mAb 1F5.

As Figuras 24 e 25 mostram resultados de um estudo de administração de um anti-CD27 mAb antes da vacina na presença ou ausência de T: LR agonista e mostram a significância de tempo de administração do anticorpo em relação à vacina.

As Figuras 26 e 27 mostram resultados de administração de anti-CD27 mAb em combinação com ativação de TCR em células T de camundongos transgênicos de CD27 humanos, como mostrado por ambos proliferação e produção de citocina.

As Figuras 28A-D são o protocolo para e resultados de um experimento que mostra que anti-CD27 melhora a eficácia de uma vacina α -DEC205-OVA em um modelo de desafio de melanoma MO4 (B16-OVA). A Figura 24A mostra o protocolo para o experimento. A Figura 24B é um gráfico plotando o tamanho do tumor (em mm²) contra número de dias após a inoculação de tumor em camundongos não tratados. A Figura 24C é um gráfico plotando o tamanho do tumor (em mm²) contra o número de dias após a inoculação de tumor em camundongos tratados com a vacina isolada. A Figura 24D é um gráfico plotando o tamanho do tumor (em mm²) contra o número de dias após a inoculação de tumor em camundongos tratados com a vacina em combinação com um anticorpo anti-CD27.

As Figuras 29A e B são gráficos que mostram sobrevida prolongada de camundongos transgênicos com CD27 humanos (modelos de

tumor) após o desafio com um linfoma singênico e administração de várias doses de anti-CD27 mAb 1F5.

As Figuras 30 a 32 mostram os resultados de um experimento que testam o efeito de tratamento anti-CD27 em modelo xenoenxertos Raji em camundongos SCID.

A Figura 30A plota o tamanho do tumor (em mm³) contra o número de dias após a inoculação do tumor em camundongos não tratados, tratados com um anticorpo IgG1 humano controle ou tratados com os anticorpos anti-CD27 1F5 e 3H8. As setas indicam os dias quando o tratamento foi administrado por injeção i.p.

A Figura 30B mostra a sobrevivência em uma curva Kaplan-Meier.

A Figura 31A plota o tamanho do tumor (em mm³) contra o número de dias após a inoculação do tumor em camundongos não tratados, tratados com um anticorpo IgG1 humano controle ou tratados com o anticorpo anti-CD27 1F5. As setas indicam os dias quando o tratamento foi administrado por injeção i.p. A Figura 31B mostra a sobrevivência em uma curva Kaplan-Meier.

A Figura 32 mostram os resultados de outro experimento que testa o efeito de tratamento anti-CD27 em modelo xenoenxertos Raji em camundongos SCID em uma curva de Kaplan-Meier.

A Figura 33 mostra os resultados de um experimento que testa o efeito de tratamento anti-CD27 em modelo xenoenxertos Daudi em camundongos SCID. A Figura 33 plota o tamanho do tumor (em mm³) contra o número de dias após a inoculação do tumor em camundongos tratados com um anticorpo IgG1 humano controle ou tratados com o anticorpo anti-CD27 1F5 (0,1 mg ou 0,3 mg). As setas indicam os dias quando o tratamento foi administrado por injeção i.p. A Figura 33B mostra a sobrevivência em uma curva Kaplan-Meier.

A **Figura 34** mostra os resultados de um ensaio ELISPOT e que a produção de IFN γ específico de antígeno melhorado usando anticorpo anti-CD27 é anulado quando a porção Fc do IgG é incapaz de engatar os receptores Fc.

5 **Descrição detalhada da invenção**

A presente invenção fornece anticorpos anti-CD27 que apresentam propriedades funcionais particulares correlacionando com benefícios terapêuticos significativos, incluindo a regulação para cima de função imune (por exemplo, respostas imunes mediadas por células T como terapias de vacina, ativação de NK em terapias de câncer), inibição do crescimento celular (por exemplo, na terapia do câncer) e regulação para baixo de respostas imune mediadas por células T (por exemplo, em terapia autoimune). Estas características funcionais incluem, por exemplo: (1) inibição de (por exemplo, bloqueia completa ou parcialmente) a ligação de CD70 solúvel a células que expressam CD27 em pelo menos cerca de 70%, ainda, por exemplo, em pelo menos 80% ou pelo menos 90% (2) ligação a um CD27 humano com um K_D de 1×10^{-9} M ou menos, (3) indução de pelo menos cerca de 40% citotoxicidade mediada por complemento (CDC) de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 μ g/ml, (4) indução de pelo menos cerca de 40% de lise específica de células que expressam CD27 por ADCC em uma concentração de 10 μ g/ml, (ainda, por exemplo, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60% ou pelo menos cerca de 70% de lise específica)(5) indução ou melhora de respostas imunes, especialmente respostas TH1 e/ou (6) indução ou melhora de atividade de célula T, especialmente números e/ou atividade de célula T CD8+. Em outras modalidades, os anticorpos incluem regiões variáveis de cadeia pesada e leve e/ou sequências CDR.

Para que a presente invenção possa ser mais facilmente entendida, certos termos são primeiro definidos. Definições adicionais são

estabelecidas em toda a descrição detalhada.

O termo “CD27” (também referenciado como “molécula CD27”, “receptor CD27L”, “S1521”, “CD27 de ativação de célula T”, “TNFRSF7,” “MGC20393,” “superfamília de fator de necrose tumoral, membro 7”, “antígeno S152 de ativação de célula T” “Tp55”, “membro 7 de superfamília de receptor de fator de necrose tumoral”, “antígeno CD27”, e “CD27 de ativação de célula T”) refere-se a um receptor que é um membro da superfamília de receptor de TNF, que se liga ao ligante CD70. CD27 é necessário para a geração e a manutenção em longo prazo da imunidade de células T e desempenha um papel fundamental na regulação da ativação de células B e síntese de imunoglobulinas. O termo “CD27” inclui qualquer variante ou isoformas de CD27 que são naturalmente expressas por células (por exemplo, CD27 humano depositado com GENBANK® contendo número de acesso AAH12160.1). Assim, os anticorpos da invenção podem ter reagir cruzada com CD27 de espécies que não humanos. Alternativamente, os anticorpos podem ser específicos para CD27 humana e não podem apresentar qualquer reatividade cruzada com outras espécies. CD27 ou quaisquer variantes e suas isoformas, pode tanto ser isolado de células ou tecidos que naturalmente as expressam ou ser recombinantemente produzidos usando técnicas bem conhecidas na técnica e/ou aquelas aqui descritas. Preferencialmente, os anticorpos são direcionados para hCD27 que tem um padrão de glicosilação normal.

GenBank ® (número de acesso AAH12160.1) relata a sequência de aminoácidos de CD27 humana como segue (SEQ ID NO:1):

```
1 marphpwwlc vlgtlvglsa tpapkscper hywaqgklcc qmcepgtflv kdcdqhrkaa
61 qcdpcipgvs fspdhhrph cesrhcnsg llvrnctita naecacrngw qcrdkectec
121 dplpnpslta rssqalsphp qpthlpyvse mleartaghm qtladfrqlp artlsthwpp
181 qrslcssdfi rilvifsgmf lvftlagalf lhqrrkyrsn kgespvpeae pcryscpree
241 egstipiqed yrkpepacsp
```

O termo “CD70” (também referenciado como “molécula CD70”, “CD27L”, “CD27LG”, “TNFSF7,” “membro 7 da superfamília de fator de necrose tumoral (ligante),” “ligante CD27,” “antígeno CD70,” “CD70 antígeno de superfície,” “superfamília de ligante de fator de necrose tumoral, membro 7,” “antígeno Ki-24,” e “CD27-L”) refere-se ao ligante para CD27 (ver, por exemplo, Bowman MR *et al.*, *J. Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):1756-61). CD70 é uma proteína transmembrana tipo II que pertence a família de ligante de fator de necrose tumoral (TNF). É um antígeno de superfície em linfócitos T e B ativados que induz a proliferação de células T coestimuladas, aumenta a geração de células T citolítica e contribui para a ativação de células T. Foi ainda sugerido que CD70 desempenha um papel na regulação da ativação de células B, função citotóxica de células natural killer e síntese de imunoglobulinas (Hintzen RQ *et al.*, *J. Immunol.* 1994 Feb 15;152(4):1762-73).

GenBank® (número de acesso NP_001243) relata a sequência de aminoácido de CD70 humano como a seguir (SEQ ID NO: 2):

```
1 mpeegsgcsv rrrpygcvlr aalvplvagl viclvvcigr faqaqqqlpl eslgwdvael
61 qlnhtgpqqd prlywqggpa lgrsflhgpe ldkgqlrihr dgiymvhiqv tlaicsstta
121 srhhpttlav gicspasrsi sllrlsfhgg ctiasqrllp largdtlctn ltgtllpsrn
181 tdetffgvqw vrp
```

O termo “anticorpo” como referenciado aqui inclui anticorpos totais e qualquer fragmento de ligação ao antígeno (ou seja, “porção de ligação ao antígeno”) ou cadeia simples do mesmo. Um “anticorpo” refere-se, em uma modalidade preferencial, a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) inter-conectadas por pontes dissulfeto, ou uma porção de ligação ao antígeno do mesmo. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável da cadeia pesada (abreviado aqui como V_H) e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é composta de três domínios, CH1, CH2 e CH3.

Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve (abreviado aqui como V_L) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da cadeia leve é composta de um domínio, CL. As regiões V_H e V_L podem ainda ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamadas de regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta de três CDRs e quatro FRs, arranjados a partir de amino-terminais a carboxi-terminais na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesadas e leves contêm um domínio de ligação que interage com o antígeno. Regiões constantes dos anticorpos podem mediar a ligação da imunoglobulina para tecidos hospedeiros ou fatores, incluindo várias células do sistema imunológico (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complemento clássico.

O termo “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente “porção de anticorpo”), como usado aqui, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo para especificamente se ligar a um antígeno (por exemplo, CD27 humano). Ditos “fragmentos” são, por exemplo entre cerca de 8 e cerca de 1500 aminoácidos em comprimento, apropriadamente entre cerca de 8 e cerca de 745 aminoácidos em comprimento, apropriadamente cerca de 8 a cerca de 300, por exemplo, cerca de 8 a cerca de 200 aminoácidos, ou cerca de 10 a cerca de 50 ou 100 aminoácidos em comprimento. Demonstrou-se que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser executada por fragmentos de um anticorpo completo. Exemplos de fragmentos de ligação incluídas dentro do termo “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo inclui (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste em domínios V_L , V_H , CL e CH1; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região em dobradiça; (iii) um

fragmento Fd que consiste em domínios V_H e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste dos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste em um domínio V_H ; e (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR) ou (vii) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que podem opcionalmente ser unidos por um ligante sintético. Além disso, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , são codificados por genes separados, podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que lhes permite serem feitos como uma cadeia de proteína única em que o par de regiões V_L e V_H forma moléculas monovalentes (conhecido como única cadeia Fv (scFv); ver por exemplo, Bird *et al.* (1988) *Science* 242: 423-426; e Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Ditos anticorpos de cadeia simples são ainda pretendidos por estar incluídos dentro do termo “porção de ligação ao antígeno” de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidos por aqueles especialistas na técnica, e os fragmentos são triados para utilidade do mesmo modo como são anticorpos intactos. Porções de ligação ao antígeno podem ser produzidas por técnicas de DNA recombinante, ou por clivagem química ou enzimática de imunoglobulinas intactas.

Um “anticorpo bifuncional” ou “biespecífico” é um anticorpo híbrido artificial contendo dois pares de cadeia pesada/leve e dois diferentes sítios de ligação. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos, incluindo a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

O termo “anticorpo monoclonal,” como usado aqui, refere-se a um anticorpo que apresenta uma especificidade de ligação única e afinidade

para um epítopo particular. Assim, o termo “anticorpo monoclonal humano” refere-se a um anticorpo que apresenta uma especificidade de ligação única e que tem regiões constantes opcionais e variáveis derivadas de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Em uma modalidade, os anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida a partir de um animal não humano transgênico, como por exemplo, um camundongo transgênico, compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene da cadeia leve fundidos com uma célula imortalizada.

O termo “anticorpo humano recombinante,” como usado aqui, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, como (a) anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que é transgênico ou transcromossômico para genes de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado do mesmo, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira para expressar o anticorpo, por exemplo, a partir de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo humano combinatorial recombinante, e (d) anticorpos preparados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolve processamento de sequências de gene de imunoglobulina humana a outras sequências de DNA. Ditos anticorpos recombinantes compreendem regiões variáveis e constantes que utilizam sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana são codificados pelos genes de linhagem germinativa, mas incluem os rearranjos subsequentes e mutações que ocorrem, por exemplo, durante a maturação de anticorpo. Como é conhecido na técnica (ver, por exemplo, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1117-1125), a região variável contém o domínio de ligação ao antígeno, que é codificado por vários genes que se rearranjam para formar um anticorpo específico para um antígeno estranho. Além de rearranjo, a região variável pode ser adicionalmente modificada por várias alterações únicas de

aminoácidos (referenciadas como mutação somática ou hipermutação) para aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno estranho. A região constante vai mudar em resposta a outro antígeno (ou seja, comutação de isotipo). Portanto, as moléculas de ácidos nucleicos rearranjadas e somaticamente mutadas que codificam os polipeptídeos imunoglobulinas de cadeia leve e cadeia pesada em resposta a um antígeno podem não ter identidade de sequência com as moléculas de ácidos nucleicos originais, mas em vez disso irão ser substancialmente idênticas ou semelhantes (ou seja, têm pelo menos 80% de identidade).

O termo “anticorpo humano” inclui anticorpos contendo regiões variáveis e constantes (se presente) de sequências de imunoglobulina de linhagem germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados pelas sequências de imunoglobulinas da linha germinativa humana (por exemplo, as mutações introduzidas por mutagênese ao acaso, ou específica para o sítio *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*) (ver, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, e Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). No entanto, o termo “anticorpo humano” não inclui anticorpos em que as sequências CDR derivadas de linhagem germinativa de outras espécies mamíferas, como um camundongo, foram enxertadas em sequências estruturas humanas (ou seja, anticorpos humanizados).

Como usado aqui, um “anticorpo heterólogo” é definido em relação ao organismo não humano transgênico que produz dito um anticorpo. Este termo refere-se a um anticorpo contendo uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de ácido nucleico codificadora correspondente à encontrada em um organismo que não consiste em animal não humano transgênico, e, geralmente, a partir de uma espécie diferente da do animal não humano

transgênico.

Um “anticorpo isolado,” como usado aqui, pretende referir-se a um anticorpo que é substancialmente isento de outros anticorpos contendo diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que especificamente se liga a CD27 humano é substancialmente isento de anticorpos que especificamente se liga a antígenos além do CD27 humano). Um anticorpo isolado que se liga especificamente a um epítopo pode, no entanto, ter reatividade cruzada com outras proteínas CD27 de diferentes espécies. No entanto, o anticorpo liga-se preferencialmente sempre a CD27 humano. Além disso, um anticorpo isolado é tipicamente substancialmente livre de outros materiais celulares, e/ou de produtos químicos. Em uma modalidade da invenção, uma combinação de anticorpos “isolados” contendo diferentes especificidades e CD27 é combinada em uma composição bem definida.

O termo “epítopo” ou “determinante antigênico” refere-se a um sítio em um antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo especificamente se liga. Epítopos podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos por dobragem terciária de uma proteína. Epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos na exposição a solventes desnaturantes, enquanto que epítopos formados por dobragem terciária são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo inclui tipicamente pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos em uma conformação espacial única. Os métodos para determinar quais epítopos estão ligados por um dado anticorpo (ou seja, mapeamento de epítopo) são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, ensaios de immunoblotting e imunoprecipitação, em que a sobreposição ou peptídeos contíguos de CD27 são testados para a reatividade com dado anticorpo anti-CD27. Os métodos de determinação da conformação

especial de epítomos incluem técnicas na prática e aquelas aqui descritas, por exemplo, cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional (ver, por exemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

5 Ainda, englobados pela presente invenção são os anticorpos que se ligam a um epítomo em CD27 que compreende a totalidade ou uma porção de um epítomo reconhecido pelos anticorpos particulares aqui descritos (por exemplo, a mesma ou uma região de sobreposição ou de uma região entre ou abrangendo a região).

10 Também englobados pela presente invenção são os anticorpos que se ligam aos mesmos epítomo, e/ou anticorpos que competem para a ligação a CD27 humano com os anticorpos aqui descritos. Os anticorpos que reconhecem o mesmo epítomo ou competem para ligação podem ser identificados utilizando técnicas de rotina. Ditas técnicas incluem, por
15 exemplo, um imunoenensaio, que mostra a capacidade de um anticorpo em bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno alvo, ou seja, um ensaio de ligação competitiva. A ligação competitiva é determinada em um ensaio em que a imunoglobulina em teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, como CD27. Vários tipos de ensaios de
20 ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio em fase sólida direta ou indireta (RIA), ensaio imunoenzimático direto ou indireto em fase sólida (EIA), ensaio de competição de sanduíche (ver Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9: 242 (1983)); EIA de biotina-avidina direta em fase sólida (ver Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensaio de marcação
25 direta em fase sólida, ensaio sanduíche de marcação direta em fase sólida (ver Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcação direta em fase sólida usando marcador I-125 (ver Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA biotina-avidina direta em fase sólida (Cheung *et al.*, *Virology* 176: 546 (1990)); e RIA de marcação

direta. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Tipicamente, dito um ensaio envolve a utilização de antígeno purificado ligado a uma superfície sólida ou células portadoras de qualquer um destes, uma imunoglobulina de teste não marcada e uma imunoglobulina de referência marcada. A inibição competitiva é medida através da determinação da quantidade de marcador ligado à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina de teste. Geralmente a imunoglobulina de teste está presente em excesso. Geralmente, quando um anticorpo de competição está presente em excesso, irá inibir a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% ou mais.

Outras técnicas incluem, por exemplo, os métodos de mapeamento de epítopo, como, análise de raios-X de cristais de antígeno:complexos de anticorpo que fornecem resolução atômica do epítopo. Outros métodos monitoram a ligação do anticorpo aos fragmentos de antígeno ou variantes mutados do antígeno onde a perda de ligação devido a uma modificação de um resíduo de aminoácido dentro da sequência do antígeno é frequentemente considerada como uma indicação de um componente epítopo. Além disso, os métodos combinatórios computacionais para mapeamento de epítopo pode também ser usado. Estes métodos baseiam-se na capacidade do anticorpo de interesse para isolar peptídeos curtos de afinidades específicas a partir de bibliotecas de peptídeos de apresentação de fagos. Os peptídeos são então considerados como pistas para a definição do epítopo correspondente ao anticorpo utilizado para triar a biblioteca de peptídeos. Para mapeamento de epítopo, algoritmos computacionais também têm sido desenvolvidos, que demonstraram mapear epítopos conformacionais descontínuos.

Como usado aqui, os termos “ligação específica,” “ligação seletiva,” “se liga seletivamente,” e “especificamente se liga,” referem-se ao à ligação de anticorpo a um epítopo em um antígeno predeterminado.

Tipicamente, o anticorpo se liga com uma constante de dissociação de equilíbrio (K_D) de aproximadamente menos do que 10^{-7} M, como aproximadamente menos do que 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda inferior quando determinada por tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR) em um instrumento BIACORE 2000 usando CD27 humano recombinantes como o analito e o anticorpo como o ligante e se liga ao antígeno predeterminado com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior do que sua afinidade para a ligação a um antígeno não específico (por exemplo, BSA, caseína) além do antígeno predeterminado ou um antígeno proximamente relacionado. As frases “um anticorpo que reconhece um antígeno” e “um anticorpo específico para um antígeno” são usados de modo intercambiável com o termo “um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno”.

O termo “ K_D ,” como usado aqui, pretende referir-se à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação de antígeno-anticorpo particular. Tipicamente, os anticorpos humanos da invenção se ligam a CD27 com uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) de aproximadamente 10^{-8} M ou menos, como menos do que 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou ainda inferior quando determinado por tecnologia de ressonância de plasmon de superfície (SPR) em um instrumento BIACORE 2000 usando CD27 humano recombinante como o analito e o anticorpo como o ligante.

O termo “ k_d ” como usado aqui, pretende referir-se a uma constante off rate para a dissociação de um anticorpo a partir do complexo anticorpo/antígeno.

O termo “ k_a ” como usado aqui, pretende referir-se a uma constante *on rate* para a associação de um anticorpo com um antígeno.

O termo “EC50,” como usado aqui, refere-se à concentração de um anticorpo ou uma poção de ligação ao antígeno do mesmo, que induz uma resposta, seja em um ensaio *in vitro* ou *in vivo*, que é 50% da resposta

máxima, ou seja, a metade entre a resposta máxima e a linha basal.

Como usado aqui, “isotipo” refere-se à classe de anticorpo (por exemplo, IgM ou IgG1) que é codificado por genes de região constante de cadeia pesada. Em uma modalidade, um anticorpo monoclonal humano da
5 invenção é o isotipo IgG1. Em outra modalidade, um anticorpo monoclonal humano da invenção é o isotipo IgG2.

O termo “se liga a CD27 imobilizado,” refere-se à capacidade de um anticorpo humano da invenção de se ligar a CD27, por exemplo, expressão na superfície de uma célula ou que é ligado a um suporte sólido.

10 O termo “reação cruzada”, como usado aqui, refere-se à capacidade de um anticorpo da invenção se ligar a CD27 a partir de uma espécie diferente. Por exemplo, um anticorpo da presente invenção que se liga a CD27 humano pode ainda se ligar a outras espécies de CD27. Como usado aqui, a reatividade cruzada é medida pela detecção de uma reatividade
15 específica com antígeno purificado em ensaios de ligação (por exemplo, SPR, ELISA) ou ligação a, ou, de outra forma, funcionalmente interagindo com, células que expressam fisiologicamente CD27. Os métodos para determinar a reatividade cruzada incluem ensaios de ligação padrão como aqui descritos, por exemplo, por análise de ressonância de plasmon de superfície Biacore™
20 (SPR) utilizando um instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suécia), ou técnicas de citometria de fluxo.

Como usado aqui, “comutação de isotipo” refere-se ao fenômeno pelo qual a classe, ou isotipo, de um anticorpo muda de uma classe Ig para uma das outras classes Ig.

25 Como usado aqui, “isotipo não comutado” refere-se a classe isotípica de cadeia pesada que é produzido quando nenhuma comutação de isotipo ocorreu; o gene CH que codifica o isotipo não comutado é tipicamente o primeiro gene CH imediatamente a jusante a partir do gene VDJ funcionalmente rearranjado. Comutação de isotipo foi classificada como

comutação de isotipo clássica e não clássica. Comutação de isotipo clássica ocorre por eventos de recombinação que envolvem pelo menos uma região de sequência de comutação no transgene. Comutação de isotipo não clássica pode ocorrer por, por exemplo, recombinação homóloga entre σ_μ humano e Σ_μ humano (deleção associada a δ). Mecanismos de comutação não clássica alternativos, como intertransgene e/ou recombinação intercromossômica, entre outros, podem ocorrer e efetuar comutação de isotipo.

Como usado aqui, o termo “sequência de comutação” refere-se àquelas sequências de DNA responsáveis pela recombinação de comutação.

Uma sequência “doadora de comutação”, tipicamente uma região de comutação μ , será 5' (ou seja, a montante) da região de constructo a ser apagada durante a recombinação de comutação. A região “aceptora de comutação” estará entre a região de constructo a ser apagada e a região constante de substituição (por exemplo, γ , ϵ , etc.). Como não há um sítio específico onde a recombinação ocorre sempre, a sequência do gene final tipicamente não será previsível a partir do constructo.

Como usado aqui, “padrão de glicosilação” é definido como o padrão de unidades de carboidratos que são covalentemente ligados a uma proteína, mais especificamente a uma proteína imunoglobulina. Um padrão de glicosilação de um anticorpo heterólogo pode ser caracterizado como sendo substancialmente semelhante aos padrões de glicosilação que ocorrem naturalmente em anticorpos produzidos pela espécie do animal não humano transgênico, quando um especialista na técnica reconhece o padrão de glicosilação do anticorpo heterólogo como sendo mais semelhante ao referido padrão de glicosilação das espécies do animal não humano transgênico do que a espécie a partir da qual os genes CH do transgene foram derivados.

O termo “ocorrência natural” como usado aqui como aplicado a um objeto refere-se ao fato de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipeptídeo ou polinucleotídeo que

está presente num organismo (incluindo vírus) que pode ser isolado a partir de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificado pelo homem no laboratório é de ocorrência natural.

5 O termo “rearranjado” como usado aqui refere-se a uma configuração de um locus de imunoglobulina de cadeia pesada ou cadeia leve em que o segmento V é posicionado imediatamente adjacente a um segmento D-J ou segmento J em uma conformação que codifica essencialmente um domínio completo V_H ou V_L , respectivamente. Um locus de gene rearranjado de imunoglobulina pode ser identificado por comparação a DNA de linhagem
10 germinativa; um locus rearranjado tem pelo menos um elemento de homologia recombinado heptâmero/nonâmero.

O termo “não rearranjado” ou “configuração de linhagem germinativa” como usado aqui em referência ao segmento V refere-se à configuração em que o segmento V não é recombinado de modo a ser
15 imediatamente adjacente a um segmento D ou J.

O termo “molécula de ácido nucleico,” como usado aqui, pretende incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de fita simples ou fita dupla, mas preferencialmente é DNA de fita dupla.

20 O termo “molécula de ácido nucleico isolada,” como usado aqui em referência aos ácidos nucleicos que codificam anticorpos ou porções de anticorpo (por exemplo, V_H , V_L , CDR3) que se ligam a CD27, pretende referir-se a uma molécula de ácido nucleico em que as sequências de nucleotídeo que codifica o anticorpo ou porção do anticorpo são isentos de
25 outras sequências de nucleotídeo que codificam anticorpos ou porções de anticorpo que se ligam a antígenos além de CD27, que outras sequências podem naturalmente flanquear o ácido nucleico em um DNA genômico humano. Por exemplo, SEQ ID NOs: 35 e 41, 47 e 53, 101 e 107, 83 e 89, 83 e 95, 23 e 29, 71 e 77 correspondem, respectivamente, às sequências de

nucleotídeo compreendendo as regiões variáveis de cadeia pesada (V_H) e cadeia leve (V_L) de anticorpos monoclonais anti-CD27 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5.

A presente invenção ainda inclui “modificações de sequência conservadas” das sequências estabelecidas em SEQ ID NOs: 5-112, ou seja, modificações de nucleotídeo e sequência de aminoácido que não anulam a ligação do anticorpo codificado por sequência de nucleotídeo ou contendo a sequência de aminoácido, ao antígeno. Ditas modificações da sequência conservadoras incluem substituições conservadoras de nucleotídeos e aminoácidos, bem como, adições de nucleotídeos e aminoácidos e deleções. Por exemplo, as modificações podem ser introduzidas em SEQ ID NOs: 5-112 por meio de técnicas convencionais conhecidas na técnica, como mutagênese direcionada ao sítio e mutagênese mediada por PCR. Substituições de aminoácidos conservadoras incluem aquelas em que o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral semelhante. As famílias de resíduos de aminoácidos contendo cadeias laterais semelhantes foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, tirosina, treonina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, histidina, fenilalanina, triptofano). Assim, um resíduo de aminoácido não essencial previsto em um anticorpo anti-CD27 humano é preferencialmente substituído com outro resíduo de aminoácido a partir da mesma família de cadeias laterais. Os métodos de identificação de substituições conservadoras de nucleotídeos e aminoácidos que não eliminam

a ligação de antígeno são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); e Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997))

5 Alternativamente, em outra modalidade, as mutações podem ser introduzidas aleatoriamente ao longo de toda ou parte de uma sequência codificadora de anticorpo anti-CD27 como, por exemplo, por mutagênese de saturação, e os anticorpos resultantes modificados anti-CD27 podem ser triados quanto à atividade de ligação.

10 Para ácidos nucleicos, o termo “homologia substancial” indica que dois ácidos nucleicos, ou sequências designadas do mesmo, quando idealmente alinhada e comparada, são idênticas, com inserções ou deleções apropriadas de nucleotídeo, em pelo menos cerca de 80% dos nucleotídeos, geralmente pelo menos cerca de 90% to 95%, e mais preferencialmente pelo
15 menos cerca de 98% a 99,5% de nucleotídeos. Alternativamente, a homologia substancial existe quando os segmentos irão hibridizar sob condições de hibridização seletivas, para o complemento da fita.

 O percentual de identidade entre duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (ou seja, % de
20 homologia = # de posições idênticas/# total de posições x 100), tendo em conta o número de lacunas, e o comprimento de cada lacuna, que precisam ser introduzidas para alinhamento ideal das duas sequências. A comparação de sequências e determinação do percentual de identidade entre duas sequências pode ser realizada usando um algoritmo matemático, como descrito nos
25 exemplos não limitantes que se seguem.

 O percentual de identidade entre duas sequências de nucleotídeos pode ser determinado utilizando o programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de lacuna de 40, 50, 60, 70, ou 80 e um peso de

comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. O percentual de identidade entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos também pode ser determinada utilizando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de peso de resíduos PAM120, uma penalidade de comprimento de lacuna de 12 e uma penalidade de lacuna de 4. Além disso, o percentual de identidade entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada utilizando o algoritmo Needleman e Wunsch (J. Mol.Biol. 444-453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG (disponível em <http://www.gcg.com>), usando uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de lacuna de 1, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

As sequências de ácido nucleico e proteína da presente invenção podem ainda ser usadas como uma “sequência query” para realizar uma pesquisa contra bases de dados públicas para, por exemplo, identificar sequências relacionadas. Ditas pesquisas podem ser realizadas utilizando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol.Biol. 215:403-10. Pesquisas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, pontuação = 100 comprimento de palavra, = 12 para se obter sequências de nucleotídeos homólogas às moléculas de ácido nucleico da presente invenção. Buscas de proteínas BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas às moléculas de proteína da invenção. Para obter alinhamentos gapped para fins de comparação, BLAST Gapped podem ser utilizados como descrito em Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25(17):3389-3402. Quando se utiliza BLAST e programas BLAST Gapped, os parâmetros default dos programas respectivos (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Veja <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, em um lisado celular, ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é “isolado” ou “gerado substancialmente puro” quando purificado fora de outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucleicos celulares ou proteínas, por técnicas padrões, incluindo tratamento alcalino /SDS, bandeamento CsCl, cromatografia em coluna, eletroforese em gel de agarose e outros bem conhecidos na técnica. Ver, F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

As composições de ácido nucleico da presente invenção, embora frequentemente em uma sequência nativa (exceto para os sítios de restrição modificados e semelhantes), de cDNA, genômico, ou misturas dos mesmos podem ser mutados de acordo com as técnicas padronizadas para fornecer sequências de genes. Para as sequências de codificação, estas mutações podem afetar a sequência de aminoácidos, como desejado. Em particular, as sequências de DNA substancialmente homólogas a ou derivadas de V, D, J, nativos, constantes, comutações e outras ditas sequências aqui descritas são contempladas (onde “derivado” indica que uma sequência é idêntica ou modificada a partir de outra sequência).

Um ácido nucleico é “operacionalmente ligado” quando é colocado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou potencializador está operativamente ligado a uma sequência de codificação se esta afetar a transcrição da sequência. Com relação às sequências reguladoras da transcrição, operativamente ligado significa que as sequências de DNA a serem ligadas são contíguas e, quando necessário para unir duas regiões codificantes de proteínas, contíguas e em região de leitura. Para sequências de comutação, operacionalmente ligado indica que as sequências são capazes de efetuar recombinação de comutação.

O termo “vetor,” como usado aqui, pretende referir-se a um ácido nucleico capaz de transportar outros ácidos nucleicos ao qual este foi ligado. Um tipo de vetor é um “plasmídeo,” que refere-se a uma alça de DNA de fita dupla circular no qual segmentos de DNA adicionais podem ser ligadas. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que os segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira que são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos contendo uma origem de replicação e vetores mamíferos episomais). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não episomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira quando da introdução na célula hospedeira, e assim são replicados juntamente com o genoma do hospedeiro. Além disso, determinados vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais estão ligados operacionalmente. Ditos vetores são referenciados aqui como “vetores de expressão recombinantes” (ou simplesmente “vetores de expressão”). Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante são geralmente na forma de plasmídeo. Na presente especificação, “plasmídeo” e “vetor” podem ser usados de modo intercambiável como o plasmídeo é a forma mais comumente usada do vetor. No entanto, a invenção destina-se a incluir ditas outras formas de vetores de expressão, como vectores virais (por exemplo, a replicação defeituosa de retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados), que servem funções equivalentes.

O termo “célula hospedeira recombinante” (ou simplesmente “célula hospedeira”), como usado aqui, pretende referir-se a uma célula em que um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos se destinam a referir-se não só à célula do indivíduo particular, mas para a descendência de dita uma célula. Devido a certas modificações poderem ocorrer em gerações sucessoras devido à mutação ou influências ambientais, dita progenia pode não, de fato, ser idêntica à célula

parental, mas são ainda incluídos no escopo do termo “célula hospedeira” como usado aqui.

Como usado aqui, o termo “antígeno” refere-se a qualquer substância natural ou imunogênica sintética, como uma proteína, peptídeo ou hapteno. Antígenos apropriados para utilização na presente invenção (por exemplo, em uma vacina em combinação com um anticorpo anti-CD27 da invenção) incluem, por exemplo, antígenos de doenças infecciosas e antígenos de tumor, contra o qual respostas protetoras ou terapêuticas são respostas imunes desejadas, por exemplo, antígenos expressos por uma célula de tumor ou um organismo patogênico ou antígenos de doenças infecciosas. Por exemplo, os antígenos adequados incluem antígenos associados a tumores para a prevenção ou o tratamento de cânceres. Exemplos de antígenos associados a tumores incluem, entre outros, as sequências que compreendem a totalidade ou parte das sequências de β hCG, gp100 ou Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, tirosinase, telomerase, SSX2 e MUC-1, antígenos, e antígenos de tumores derivados de células germinativas. Antígenos associados a tumores incluem também os antígenos dos grupos sanguíneos, por exemplo, antígenos Le^a, Le^b, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. Em alternativa, mais do que um antígeno pode ser incluído dentro dos constructos antígeno anticorpo da presente invenção. Por exemplo, um antígeno MAGE pode ser combinado com outros antígenos, como melanina A tirosinase, gp100 e, juntamente com adjuvantes, como GM-CSF ou IL-12, e ligada a um anticorpo anti-APC.

Outros antígenos apropriados incluem antígenos virais para a prevenção ou tratamento de doenças virais. Exemplos de antígenos virais incluem, entre outros, HIV-1 gag, HIV-1 env, HIV-1 nef, HBV (antígenos de superfície ou do núcleo), HPV, FAS, HSV-1, HSV-2, p17, antígenos ORF2 e ORF3. Exemplos de antígenos bacterianos incluem, entre outros, Toxoplasma

gondii ou *Treponema pallidum*. Os conjugados anticorpo-antígeno bacterianos da invenção podem ser no tratamento ou prevenção de várias doenças bacterianas, como Antrax, botulismo, tétano, clamídia, cólera, difteria, doença de Lyme, a tuberculose e sífilis. Outros antígenos apropriados de agentes patogênicos de doenças infecciosas, como vírus, bactérias, parasitas e fungos são revelados abaixo.

Sequências de antígenos anteriores são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um exemplo de uma sequência MAGE-3 cDNA é fornecida em US 6,235,525 (Ludwig Institute for Cancer Research); exemplos de sequências de ácido nucleico e proteína NY-ESO-1 são fornecidos em US 5.804.381 e US 6.069.233 (Ludwig Institute for Cancer Research); exemplos de sequências de ácido nucleico e proteína Melan-A são fornecidos em US 5.620.886 e US 5.854.203 (Ludwig Institute for Cancer Research); exemplos de sequências de ácido nucleico e proteína NY-BR-1 são fornecidos em US 6.774.226 e US 6.911.529 (Ludwig Institute for Cancer Research) e exemplos de sequência de ácido nucleico e proteína de NY-CO-58 são fornecidos em WO 02090986 (Ludwig Institute for Cancer Research); um exemplo de uma sequência de aminoácido para a proteína HER-2/neu está disponível em GENBANK® N.º de acesso AAA58637; e uma sequência de nucleotídeo (mRNA) para antígeno carcinoembrionário humano tipo 1 (CEA-1) está disponível em GENBANK® N.º de acesso NM__020219.

Um antígeno HPV que pode ser usado nas composições e métodos da invenção pode incluir, por exemplo, um antígeno HPV-16, um antígeno HPV- 18, um antígeno HPV-31, um antígeno HPV-33 e/ou um antígeno HPV-35; e é apropriadamente um antígeno HPV-16 e/ou um antígeno HPV-18. Um genoma de HPV-16 é descrito em Virology, 145: 181-185 (1985) e sequências de DNA que codificam HPV-18 são descritos na patente US 5.840.306, as revelações das quais são incorporadas por referência aqui em suas totalidades. Antígenos HPV-16 (por exemplo, regiões

sororeativas de proteínas E1 e/ou E2 de HPV-16) são descritos na Patente US 6.531.127, e antígenos HPV-18 (por exemplo, regiões sororeativas de proteínas L1 e/ou L2 de HPV-18) são descritos na Patente US 5.840.306, as revelações das quais são incorporadas por referência aqui. Da mesma forma, um genoma completo do HBV está disponível na GENBANK ® N.º de
5 acesso NC_003977, cuja revelação é aqui incorporada. O genoma de HCV é descrito no Pedido de Patente Europeia 318 216, cuja revelação é aqui incorporada. PCT/US90/01348, aqui incorporada por referência, revela informação sobre a sequência dos clones do genoma de HCV, as sequências
10 de aminoácidos das proteínas virais do HCV e os métodos de produção e utilização de ditas composições para vacinas de HCV compreendendo as proteínas do HCV e peptídeos derivados.

Os peptídeos antigênicos de proteínas (ou seja, esses epítomos contendo células T) podem ser identificados em uma variedade de maneiras
15 bem conhecidas na técnica. Por exemplo, os epítomos de células T podem ser previstos através da análise da sequência da proteína com base na web utilizando algoritmos de previsão (BIMAS & SYFPEITHI) para gerar potenciais peptídeos de ligação a MHC de classe I e II que correspondem a uma base de dados interna de 10.000 bem caracterizados peptídeos de ligação
20 a MHC previamente definido pelas CTLs. Peptídeos de pontuações elevadas podem ser classificados e selecionados como “interessante” com base em alta afinidade de certa molécula MHC.

Outro método para a identificação de peptídeos antigênicos que contêm epítomos de células T é dividindo a proteína em peptídeos não
25 sobrepostos de comprimento desejado ou peptídeos sobrepostos de comprimentos desejados que podem ser produzidos de forma recombinante, sinteticamente, ou em certas situações limitadas, por clivagem química da proteína e testado para as propriedades imunogênicas, por exemplo, induzindo uma resposta de células T (ou seja, proliferação ou secreção de linfocina).

Para determinar epítomos de células T precisos da proteína em, por exemplo, técnicas de mapeamento fino, um peptídeo contendo atividade de estimulação de células T e assim compreendendo pelo menos um epítomo de célula T, como determinado por técnicas de biologia das células T, podem ser modificados pela adição ou deleção de resíduos de aminoácidos em uma ou outra terminação amino ou carboxi do peptídeo e testado para determinar uma mudança na reatividade das células T ao peptídeo modificado. Se dois ou mais peptídeos que partilham uma área de sobreposição na sequência da proteína nativa demonstraram ter atividade estimulante de células T humanas, como determinado por técnicas de biologia das células T, os peptídeos adicionais podem ser produzidos compreendendo todo ou uma porção de tais peptídeos e estes peptídeos adicionais podem ser testados por um processo semelhante. Seguindo esta técnica, os peptídeos são selecionados e produzidos recombinantemente ou sinteticamente. Os peptídeos são selecionados com base em vários fatores, incluindo a força da resposta das células T ao peptídeo (por exemplo, índice de estimulação). As propriedades físicas e químicas destes peptídeos selecionados (por exemplo, solubilidade, estabilidade), podem então ser analisadas para determinar se os peptídeos são adequados para utilização em composições terapêuticas ou se os peptídeos requerem modificação.

O termo “célula apresentadora de antígeno” ou “APC” é uma célula que apresenta antígeno estranho complexado com MHC em sua superfície. As células T reconhecem este complexo usando um receptor de célula T (TCR). Exemplos de APCs incluem, entre outros, células dendríticas (DC), células mononucleares do sangue periférico (PBMC), monócitos (como THP-1), células B linfoblastoide (como C1R. A2, 1518 B-LCL) e células dendríticas derivadas de monócitos (DCs). Alguns APCs internalizam antígenos ou por fagocitose ou por endocitose mediada por receptor. Exemplos de receptores da APC incluem, entre outros, lecitinas tipo C, como,

receptor de célula dendrítica humana e epiteliais 205 (CD27) e o receptor de manose de macrófagos humanos.

O termo “apresentação de antígeno” refere-se ao processo pelo qual APCs captura antígenos e permite seu reconhecimento por células T, por exemplo, como um componente de um conjugado MHC-I e/ou MHC-II.

“Moléculas MHC” inclui dois tipos de moléculas, MHC de classe I e MHC de classe II. Moléculas de MHC de classe I apresentam antígeno a células T específicas CD8+ e moléculas MHC de classe II apresentam antígeno a células T CD4+ específicas. Antígenos fornecidos exogenamente a APCs são processados primeiramente para a associação com MHC de classe II. Em contraste, antígenos fornecidos exogenamente a APCs são processados primeiramente para a associação com MHC de classe I.

Como usado aqui, o termo “agente imunoestimulatório” incluem, entre outros, a compostos capazes de estimular APCs, como DCs e macrófagos. Por exemplo, agentes imunoestimulantes apropriados para uso na presente invenção são capazes de estimular APCs, de modo que o processo de maturação dos APCs é acelerado, a proliferação de APCs é aumentada, e/ou o recrutamento ou liberação de moléculas co-estimulatórias (por exemplo, moléculas CD80, CD86, ICAM-1, MHC e CCR7) e citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, e IFN- γ) é regulado para cima. Agentes imunoestimulantes adequados são também capazes de aumentar a proliferação de células T. Ditos agentes imunoestimulantes incluem, entre outros, ligante CD40; ligante FLT 3; citocinas, como IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IL-2; fatores estimuladores de colônia, como G-CSF (fator estimulador de colônia de granulócito) e GM-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago granulócito); um anticorpo anti-CTLA-4, anticorpo anti-PD1, anticorpo anti-41BB, ou anticorpo anti-OX-40; LPS (endotoxina); ssRNA; dsRNA; bacilo Calmette-Guerin (BCG); Levamisol cloridrato; e globulinas imune intravenosas. Em uma modalidade, um agente

imunoestimulante pode ser um agonista de receptor tipo Toll (TLR). Por exemplo, o agente imunoestimulante pode ser um agonista de TLR3, como de cadeia dupla inosina: citosina polinucleotídeo (Poly I:C, por exemplo, disponível como AmpligenTM de Hemispherx Bipharma, PA, US ou Poly IC:LC de Oncovir) ou Poly A:U; um agonista TLR4 como um lipídeo monofosforila A (MPL) ou RC-529 (por exemplo, como disponível de GSK, UK); um agonista TLR5 como flagelina; um agonista TLR7 ou TLR8 como uma imidazoquinolina agonista de TLR7 ou TLR 8, por exemplo imiquimod (por exemplo, AldaraTM) ou resiquimod e agentes imidazoquinolina relacionados (por exemplo, como disponível de 3M Corporation); ou um agonista TLR 9 como um deoxinucleotídeo com motivos desmetilados CpG (assim chamados “CpGs”, por exemplo, como disponível de Coley Pharmaceutical). Um agente imunoestimulante preferencial é um agonista de TLR3, eu preferencialmente Poli I: C. Ditos agentes imunoestimulantes podem ser administrados simultaneamente, separadamente ou sequencialmente com os anticorpos e constructos da presente invenção e podem ainda ser fisicamente ligados aos anticorpos e constructos.

Como usado aqui, o termo “ligado” refere-se à associação de duas ou mais moléculas. A ligação pode ser covalente ou não covalente. A ligação também pode ser genética (ou seja, recombinantemente fundida). Ditas ligações podem ser alcançadas utilizando uma grande variedade de técnicas reconhecidas na prática, como a conjugação química e a produção de proteína recombinante.

Como usado aqui, o termo antígeno de “apresentação cruzada” refere-se à apresentação de antígenos de proteína exógenos a células T através de moléculas de MHC classe I e classe II em APCs.

Como usado aqui, o termo “resposta mediada por célula T” referem-se a qualquer resposta mediada por células T, incluindo células T efetoras (por exemplo, células CD8+) e células T helper (por exemplo, células

CD4+). A resposta mediada por célula T inclui, por exemplo, citotoxicidade de célula T e proliferação.

Como usado aqui, o termo “resposta de linfócito T citotóxico (CTL)” refere-se a uma resposta imune induzida por células T citotóxicas.

5 Respostas CTL são mediadas principalmente por células T CD8+.

Como usado aqui, os termos “inibe” ou “bloqueia” (por exemplo, referindo à inibição/bloqueio de ligação de CD70 a CD27 em células) são usados de modo intercambiável e inclui ambos inibição/bloqueio parcial e completo. A inibição/bloqueio de CD70 preferencialmente reduz ou
10 altera o nível normal ou tipo de atividade que ocorre quando a ligação a CD70 ocorre sem inibição ou bloqueio. A inibição e bloqueio são ainda pretendidos para incluir qualquer redução mensurável na afinidade de ligação de CD70 quando em contato com um anticorpo anti-CD27 como comparado a CD70 não em contato com um anticorpo anti-CD27, por exemplo, inibe a ligação de
15 CD70 em pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou 100%. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-CD27 inibe a ligação de CD70 em pelo menos cerca de 70%. Em outra modalidade, o anticorpo anti-CD27 inibe a ligação de CD70 em pelo menos cerca de 80%.

20 Como usado aqui, o termo “inibe o crescimento” (por exemplo, referindo às células) pretende incluir qualquer redução mensurável no crescimento de uma célula, por exemplo, a inibição de crescimento de uma célula em pelo menos cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, ou 100%.

25 Os termos “induzindo uma resposta imune” e “aumentando uma resposta imune” são usados de modo intercambiável e refere-se à estimulação de uma resposta imune (ou seja, passiva ou adaptativa) a um antígeno particular. Os termos “induz” como usado com relação a indução de CDC ou ADCC refere-se ao estímulo de mecanismos particulares de morte

celular direta. Por exemplo, em uma modalidade, o anticorpo induz, pelo menos, cerca de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ou 60% de lise, através de CDC de células que expressam CD27, a uma concentração de 10µg/ml. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo induz pelo menos cerca de 40 % de lise através de CDC de células que expressam CD27 em uma concentração de 10µg/ml. Em outra modalidade, o anticorpo induz, pelo menos, cerca de 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 75, 80 ou 85% de lise, através de ADCC (ou seja, lise específica) de células que expressam CD27, a uma concentração de 10µg/ml. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo induz pelo menos cerca de 40% de lise através de ADCC de células que expressam CD27 em uma concentração de 10µg/ml.

Os termos “tratar,” “tratando,” e “tratamento,” como usado aqui, referem-se a medidas terapêuticas ou preventivas descritas aqui. Os métodos de “tratamento” empregam administração a um indivíduo, em necessidade de dito tratamento, um anticorpo humano da presente invenção, por exemplo, um indivíduo em necessidade de uma resposta imune melhorada contra um antígeno particular ou um indivíduo que ultimamente pode adquirir dito um distúrbio, para prevenir, curar, retardar, reduzir a gravidade de, ou amenizar um ou mais sintomas do distúrbio ou distúrbio recorrente, ou para prolongar a sobrevivência de um indivíduo além daquele esperado na ausência de dito tratamento.

O termo “dose efetiva” ou “dosagem efetiva” é definido como uma quantidade suficiente para conseguir ou pelo menos parcialmente conseguir o efeito desejado. O termo “dose terapeuticamente eficaz” é definido como uma quantidade suficiente para curar ou pelo menos parcialmente parar a doença e suas complicações em um paciente que já sofre da doença. Quantidades efetivas para este uso irão depender da gravidade do distúrbio sendo tratado e o estado geral do próprio sistema imune do paciente.

O termo “paciente” inclui indivíduo humano e outros

mamíferos que recebem tratamento profilático ou terapêutico.

Como usado aqui, o termo “indivíduo” inclui qualquer humano ou animal não humano. Por exemplo, os métodos e composições da presente invenção podem ser usados para tratar um indivíduo com um distúrbio imunológico. O termo “animal não humano” inclui todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, como primatas não humanos, ovelhas, cão, vaca, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

Vários aspectos da invenção são descritos em mais detalhe nas seguintes subsecções.

10 I. Produção de Anticorpos para CD27

A presente invenção compreende anticorpos, por exemplo, anticorpos totalmente humanos, que ligam CD27, por exemplo, CD27 humano. Anticorpos monoclonais exemplares que se ligam a CD27 incluem 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5. Anticorpos monoclonais da invenção podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas conhecidas, como a técnica de hibridização somática padrão descrita por Kohler e Milstein, Nature 256:495 (1975). Embora procedimentos de hibridização somática sejam preferenciais, em princípio, outras técnicas para a produção de anticorpos monoclonais também podem ser empregadas, por exemplo, transformação viral ou oncogênica de linfócitos B, técnica de apresentação de fago usando bibliotecas de genes de anticorpo humano.

Assim, em uma modalidade, um método de hibridoma é usado para produzir um anticorpo que se liga CD27 humano. Neste método, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado pode ser imunizado com um antígeno apropriado para induzir linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que irão ligar especificamente ao antígeno usado para a imunização. Como alternativa, linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Linfócitos, em seguida, podem ser fundidos com células de mieloma, usando um agente de fusão apropriado, como o polietileno glicol, para formar uma

célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). O meio de cultura em que as células do hybridoma estão crescendo é analisado para a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno. Depois que as células de hibridoma são identificadas que produzem anticorpos da especificidade desejada, afinidade, e/ou atividade, os clones podem ser subclonados, limitando os procedimentos de diluição e cultivados por métodos padrão (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura apropriados para esta finalidade incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI-1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas *in vivo* como tumores de ascite em um animal. Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones podem ser separados do meio de cultura, fluido de ascite ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencional como, por exemplo, Sepharose de proteína A, cromatografia hidroxilapatite, gel eletroforese, diálise ou cromatografia de afinidade.

Em outra modalidade, anticorpos e porções de anticorpo que se ligam a CD27 humano podem ser isolados de bibliotecas do anticorpo fago geradas usando as técnicas descreveram, por exemplo, McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) e Hoet *et al* (2005) *Nature Biotechnology* 23, 344-348 ; Patente US 5.223.409; 5.403.484; e 5.571.698 para Ladner *et al.*; Patentes US 5.427.908 e 5.580.717 para Dower *et al.*; Patentes US 5.969.108 e 6.172.197 para McCafferty *et al.*; e Patentes US 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 e 6.593.081 para Griffiths *et al.*. Além disso, a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (faixa de nM) por embaralhamento de cadeia (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), bem como infecção combinatorial e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construção de bibliotecas de

fagos muito grandes (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)) pode ainda ser usado.

Em uma modalidade particular, o anticorpo que se liga a CD27 humano é produzido usando a técnica de exposição de fago descrita por Hoet *et al.*, *supra*. Esta técnica envolve a geração de uma biblioteca de Fab humano contendo uma combinação única de sequências de imunoglobulina isolada de doadores humanos e contendo diversidade sintética nas CDRs de cadeia pesada é gerada. A biblioteca é então selecionada para Fabs que se ligam ao CD27 humano.

O sistema de animal preferencial para a geração de hibridomas que produzem anticorpos da invenção é o sistema de murino. A produção de hibridoma no camundongo é bem conhecida na técnica, incluindo protocolos de imunização e técnicas para isolar e fundir esplenócitos imunizados.

Em uma modalidade, anticorpos direcionados contra CD27 são gerados usando camundongos transgênicos ou transcromossômicos contendo partes do sistema imunológico humano, ao invés do sistema de camundongo. Em uma modalidade, a invenção emprega camundongos transgênicos referenciados aqui como “camundongos HuMAb” que contêm um gene monoloci de imunoglobulina humana que codifica as sequências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e cadeia leve κ , juntos com mutações direcionadas que inativam o loci de cadeia μ e κ endógenos (Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Por conseguinte, os camundongos apresentam reduzida expressão do IgM ou κ de camundongo, e em resposta à imunização, os transgenes introduzidos de cadeia leve e pesada humanas sofrem mutação somática e comutação de classe para gerar anticorpos monoclonais de alta afinidade IgG κ (Lonberg, s. *et al.* (1994), *supra*; revisado em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, e Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546).

A preparação de camundongos HuMAb é descrita em detalhes na secção II abaixo e em Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg *et al.*, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Ver ainda, Patentes US 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; e 5.770.429; todos para Lonberg e Kay, e GenPharm International; Patente US 5.545.807 para Surani *et al.*;

15 Publicação internacional Nos. WO 98/24884, publicada em 11 de junho de 1998; WO 94/25585, publicado em 10 de novembro de 1994; WO 93/1227, publicado em 24 de junho de 1993; WO 92/22645, publicado em 23 de dezembro de 1992; WO 92/03918, publicado em 10 de março de 1992.

Imunizações

20 Para gerar anticorpos totalmente humano para CD27, camundongos transgênicos transcromossômicos que contêm genes de imunoglobulina humana (por exemplo, HCo12, HCo7 ou KM de camundongos) podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno CD27 e/ou células que expressam CD27, como, por

25 exemplo, descrito por Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 e WO 98/24884. Conforme descrito aqui, camundongos HuMAb são imunizados com proteínas CD27 recombinantes ou linhagens celulares que expressam CD27 como imunógenos. Como alternativa, os camundongos podem ser imunizados

com DNA que codifica CD27 humano. Preferencialmente, os camundongos terão 6-16 semanas de idade, após a primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou enriquecida (5-50 µg) do antígeno recombinante CD27 pode ser usada para imunizar camundongos HuMAb intraperitonealmente. No caso em que as imunizações utilizando uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno CD27 não resultam em anticorpos, camundongos também podem ser imunizados com células expressando CD27, por exemplo, uma linhagem de células, para promover a resposta imune. Linhagens celulares exemplares incluem linhagens de células CHO e Raji estáveis que super expressam CD27.

Experiência acumulada com vários antígenos demonstrou que camundongos HuMAb transgênicos respondem melhor quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) ou por via subcutânea (SC) com antígeno no adjuvante de Freund completo, seguido por imunizações em semanas intervaladas de IP/SC (até um total de 10) com antígeno no adjuvante de Freund incompleto. A resposta imune pode ser monitorada ao longo do protocolo de imunização com amostras de plasma, sendo obtidas por sangria retroorbital. O plasma pode ser rastreado por ELISA (como descrito abaixo), e camundongos com suficientes títulos de imunoglobulina humana anti-CD27 podem ser usados para fusões. Os camundongos podem ser reforçados por via intravenosa com antígeno 3 dias antes do sacrifício e a remoção do baço.

Geração de hibridomas produzindo anticorpos monoclonais para CD27

Para gerar hibridomas produzindo anticorpos monoclonais para CD27, esplenócitos e células de linfonodos a partir de camundongos imunizados podem ser isoladas e fundidas a uma linhagem celular imortalizada apropriada, como uma linhagem de células de mieloma múltiplo do camundongo. As hibridomas resultantes podem então ser triadas para a produção de anticorpos antígeno-específicos. Por exemplo, suspensões de

célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados podem ser fundidas para SP2/0-Ag8. 653 células de mieloma de camundongo não secretor (ATCC, CRL 1580) com 50% PEG (p/v). Células podem ser plaqueadas em aproximadamente 1×10^5 na placa de microtitulação de fundo plano, seguido por uma incubação de duas semanas contendo meio seletivo além de reagentes habituais 10% soro fetal do Clone, 5-10% hibridoma de origen fator de clonagem (IG) e 1 X HAT (Sigma). Depois de aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas no meio em que HAT é substituído com HT. Os poços individuais, em seguida, podem ser triados por ELISA para anticorpos de IgM e IgG monoclonais anti-CD27 humana, ou para ligação à superfície de células expressando CD27, por exemplo, uma linhagem de células CHO expressando CD27, por FLISA (teste de imunoabsorção de fluorescência). Uma vez que o crescimento de hibridoma extensivo ocorre, o meio pode ser observado geralmente após 10-14 dias. O anticorpo que segrega hibridomas pode ser substituído, apresentado novamente, e se ainda positivo para IgG, os anticorpos monoclonais anti-CD27 podem ser subclonados pelo menos duas vezes limitando a diluição. Os subclones estáveis, em seguida, podem ser cultivados *in vitro* para gerar anticorpos em meio de cultura de tecido para a caracterização.

20 *Geração de transfectomas produzindo anticorpos monoclonais para CD27*

Os anticorpos da invenção também podem ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de gene como é bem conhecida na técnica (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

25 Por exemplo, em uma modalidade, os genes de interesse, por exemplo, genes de anticorpo humano, podem ser ligados em um vetor de expressão como um plasmídeo de expressão eucariótico como usado pelo sistema de expressão de gene GS revelado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338 841 ou outros sistemas de expressão bem conhecidos na técnica. O

plasmídeo purificado com os genes clonados de anticorpo pode ser introduzido em células eucarióticas como células CHO ou células NSO ou alternativamente outras células eucarióticas, como células derivadas de planta, fungos ou leveduras. O método utilizado para introduzir esses genes poderiam
5 ser métodos descritos na técnica como electroporação, lipofectina, lipofectamina ou outro. Depois de introduzir estes genes de anticorpo nas células hospedeiras, as células expressando o anticorpo podem ser identificadas e selecionadas. Estas células representam os transfectomas que podem ser amplificados para seus níveis de expressão e com aumento de
10 escala para produzir anticorpos. Os anticorpos recombinantes podem ser isolados e purificados a partir destes sobrenadantes de cultura e/ou células.

Alternativamente, estes genes de anticorpo clonados podem ser expressos em outros sistemas de expressão como *E. coli* ou em organismos completos ou podem ser sinteticamente expressos.

15 *Uso de sequências parciais de anticorpo para expressar anticorpos intactos*

Anticorpos interagem com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácidos que estão localizados em seis regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada e leve (CDRs). Por esta razão, as sequências de aminoácidos dentro de CDRs são mais
20 diversificadas entre anticorpos individuais do que sequências fora de CDRs. Devido a sequências CDR serem responsáveis pela maioria das interações antígeno-anticorpo, é possível expressar anticorpos recombinantes que imitam as propriedades específicas de anticorpos que ocorrem naturalmente construindo vetores da expressão que incluem sequências CDR a partir de
25 anticorpo de ocorrência natural específico enxertado em sequências estruturais a partir de um anticorpo diferente com propriedades diferentes (ver, por exemplo, Riechmann, L. *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-525; e Queen, C. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 86:10029-10033). Ditas sequências estruturas podem obtidas em

bancos de dados de DNA públicos que incluem sequências de genes de anticorpo de linhagem germinativa. Estas sequências de linhagem germinativa diferem de sequências de genes de anticorpo maduro, porque não incluem genes variáveis completamente montados, que são formados por união de V(D)J durante a maturação de células B. Sequências de genes da linhagem germinativa irão ainda diferir das sequências de um anticorpo repertório secundário de alta afinidade no indivíduo uniformemente em toda a região variável. Por exemplo, mutações somáticas são relativamente pouco frequentes na porção amino-terminal da região da estrutura. Por exemplo, mutações somáticas são relativamente pouco frequentes na porção amino-terminal da 1ª região da estrutura e na porção carboxil-terminal da região estrutural 4. Além disso, muitas mutações somáticas não alteram significativamente as propriedades de ligação do anticorpo. Por esta razão, não é necessário obter toda a sequência de DNA de um anticorpo específico para recriar um anticorpo recombinante intacto, tendo propriedades de ligação semelhantes ao anticorpo original (ver PCT/US99/05535 depositado em 12 de março de 1999). Sequência parcial de cadeia leve e pesada, abrangendo as regiões CDR é normalmente suficiente para essa finalidade. A sequência parcial é usada para determinar qual variável da linhagem germinativa e unindo segmentos de gene contribuiu para os genes variáveis do anticorpo recombinadas. A sequência da linhagem germinativa é então usada para preencher partes ausentes das regiões variáveis. Sequências líderes de cadeia pesada e leve são modificadas durante a maturação da proteína e não contribuem para as propriedades do anticorpo final. Para adicionar sequências faltantes, sequências de cDNA clonadas podem ser combinadas com oligonucleotídeos sintéticos por ligação ou amplificação por PCR. Alternativamente, toda a região variável pode ser sintetizada como um conjunto de oligonucleotídeos curtos, sobrepostos e combinados por amplificação por PCR para criar um clone de região variável totalmente

sintético. Este processo tem algumas vantagens como a eliminação ou inclusão ou sítios de restrição particulares ou otimização de códons particulares.

As sequências de nucleotídeos de transcritos de cadeia pesada e leve a partir de uma hibridoma são usadas para projetar um conjunto de sobreposição de oligonucleotídeos sintéticos para criar sequências sintéticas de V com capacidades de codificação de aminoácidos idênticos como as sequências naturais. As sequências de cadeia pesada e capa sintéticas podem diferir das sequências naturais de três modos: cadeias de nucleotídeos repetidas são interrompidas para facilitar a síntese do oligonucleotídeo e amplificação por PCR; sítios de início de tradução são incorporados de acordo com as regras Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870); e, sítios HindIII são projetados a montante dos sítios de início de tradução.

Para ambas as regiões de cadeia leve e pesada, a codificação otimizada e não codificação correspondente, sequências de fita são quebradas em 30-50 nucleotídeos aproximadamente o ponto médio do oligonucleotídeo não codificante correspondente. Assim, para cada cadeia, os oligonucleotídeos podem ser montados em sobreposição de conjuntos de fita dupla que abrangem segmentos de 150-400 nucleotídeos. Os pools são então usados como modelos para produzir produtos de amplificação do PCR de 150-400 nucleotídeos. Tipicamente, um conjunto do oligonucleotídeo de região única variável será dividido em dois pools que são amplificados separadamente para gerar dois produtos do PCR de sobreposição. Estes produtos sobrepostos são então combinados por amplificação por PCR para formar a região variável completa. Pode ainda ser desejável incluir um fragmento de sobreposição da região constante de cadeia pesada ou leve (incluindo o sítio BbsI de cadeia leve capa, ou o sítio AgeI se a cadeia pesada é gama) na amplificação de PCR para gerar fragmentos que podem ser facilmente clonados nos constructos do vetor de expressão.

As regiões variáveis de cadeia leve e pesada reconstruídas são então combinadas com promotor clonado, sequência líder, início de tradução, sequência líder, região constante, 3' não traduzida, poliadenilação e terminação de transcrição, sequências para formar constructos de vetor de expressão. Os constructos de expressão de cadeia pesada e leve podem ser combinados em um vetor único, co-transfectado, transfectado serialmente ou transfectado separadamente em células hospedeiras que são então fundidos para formar uma célula hospedeira que expressa ambas as cadeias.

Plasmídeos para uso na construção de vetores de expressão foram construídos para que as sequências de cDNA de cadeia leve capa V e cadeia pesada V amplificadas por PCR não poderiam ser usadas para reconstruir minigenes de cadeia pesada leve completas. Estes plasmídeos podem ser usados para expressar completamente anticorpos humanos IgG₁κ ou IgG₄κ. Anticorpos totalmente humanos e quiméricos da presente invenção também incluem anticorpos IgG₂, IgG₃, IgE, IgA, IgM e IgD. Plasmídeos semelhantes podem ser construídos para expressão de outros isotipos de cadeia pesada ou para expressão de anticorpos compreendendo cadeias leve lambda.

Assim, em outro aspecto da invenção, características estruturais de anticorpos anti-CD27 da invenção são usadas para criar anticorpos anti-CD27 estruturalmente relacionadas que mantêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, como, por exemplo,

(1) inibir (por exemplo, bloquear completamente ou parcialmente) ligação de CD70 a células que expressam CD27 em pelo menos cerca de 70% (por exemplo, em pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 70%, em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml);

(2) liga a um CD27 humano com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10⁻⁹ M ou menos, ou alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10⁺⁹ M⁻¹ ou mais

(3) induz pelo menos cerca de 30% citotoxicidade mediada por complemento (CDC) de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml (ou induz pelo menos 30%, ou pelo menos cerca de 40% ou pelo menos 40% CDC de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml);

(4) induz pelo menos cerca de 30% de lise mediada por ADCC específica de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml (ou induz pelo menos 30%, ou pelo menos cerca de 40% ou pelo menos 40% de lise mediada por ADCC específica de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml);

(5) prevenir ou inibir o crescimento de células de tumor que expressam CD27e em um modelo de xenoenxertos (por exemplo, reduz o tamanho do tumor em vários camundongos de imunodeficiência combinada grave (SCID) em pelo menos cerca de 50% 20 dias após a inoculação de célula de tumor *in vivo* em 0, 5mg ip em pelo menos 6 dias);

(6) induz ou melhora respostas imunes específicas de antígeno quando combinados com uma vacina ou outro antígeno;

(7) induza ou aumenta as respostas imunes, em particular, entre outras, a resposta imune de TH1;

(8) induz ou aumenta a atividade das células T, em particular, entre outras, números de células T CD8+ específicas ou atividade funcional ou proliferação ou ativação de célula T; e/ou

(9) reduz ou inibe a proliferação ou ativação de célula T. Em uma modalidade, uma ou mais regiões CDR de anticorpos da invenção podem ser combinados recombinantemente com regiões estruturas conhecidas e CDRs para criar anticorpos anti-CD27 adicionais recombinantemente projetados da invenção. As regiões estruturas variáveis de cadeia pesada e leve podem ser derivadas de sequências iguais ou diferentes de anticorpos. As sequências de anticorpo podem ser as sequências de anticorpos de ocorrência

natural ou podem ser sequências consenso de vários anticorpos. Ver Kettleborough *et al.*, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger *et al.*, *Protein Engineering* 6:971 (1993) e Carter *et al.*, WO 92/22653.

Assim, em outra modalidade, a invenção fornece um método
 5 para preparar um anticorpo anti-CD27 incluindo: preparar um anticorpo
 incluindo (1) regiões estruturais de cadeia pesada e CDRs de cadeia pesada,
 onde pelo menos uma das CDRs de cadeia pesada incluem uma sequência de
 aminoácido selecionada de sequências de aminoácidos CDRs mostradas em
 SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 26, 27, 28, 38, 39, 40, 50, 51, 52, 62, 63, 64, 74, 75,
 10 76, 86, 87, 88, 104, 105, 106; e (2) regiões estruturas de cadeia leve e CDRs
 de cadeia leve, onde pelo menos uma das CDRs de cadeia leve inclui uma
 sequência de aminoácido selecionada de sequências de aminoácidos de CDRs
 mostrado nas SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 20, 21, 22, 32, 33, 34,
 44, 45, 46, 56, 57, 58, 68, 69, 70, 80, 81, 82, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 110, 111,
 15 112; onde o anticorpo retêm a capacidade de ligação a CD27. A capacidade
 do anticorpo para se ligar a CD27 pode ser determinada usando ensaios de
 ligação padrão, como aqueles estabelecidos nos Exemplos (por exemplo,
 ELISA ou FLISA).

É bem conhecido na técnica que domínios CDR3 de cadeia
 20 pesada e leve de anticorpo desempenha um papel particularmente importante
 na especificidade de ligação/afinidade de um anticorpo para um antígeno (*ver*,
 Hall *et al.*, *J. Immunol.*, 149:1605-1612 (1992); Polymenis *et al.*, *J. Immunol.*,
 152:5318-5329 (1994); Jahn *et al.*, *Immunobiol.*, 193:400-419 (1995); Klimka
et al., *Brit. J. Cancer*, 83: 252-260 (2000); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.*,
 25 296:833-849 (2000); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8910-8915
 (1998); Barbas *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 116:2161-2162 (1994); Ditzel *et al.*,
J. Immunol., 157:739-749 (1996)). Assim, os anticorpos recombinantes da
 invenção preparados como estabelecido acima preferencialmente
 compreendem os CDR3s de cadeia pesada e/ou leve de anticorpos 1F5, 1H8,

3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5. Os anticorpos podem ainda compreender os CDR2s de anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5. Os anticorpos podem ainda compreender os CDR1s de anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5. Os anticorpos podem ainda compreender qualquer combinação de CDRs.

Assim, em uma modalidade, a invenção ainda fornece anticorpos anti-CD27 compreendendo: (1) regiões estruturais de cadeia pesada, uma região CDR1 de cadeia pesada, uma região CDR2 de cadeia pesada, e uma região CDR3 de cadeia pesada, em que a região CDR3 de cadeia pesada é selecionada de CDR3s de 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5 e (2) regiões estruturais de cadeia leve, uma região CDR1 de cadeia leve, uma região CDR2 de cadeia leve, e uma região CDR3 de cadeia leve, em que a região CDR3 de cadeia leve é selecionada de CDR3s de 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5, em que o anticorpo se liga a CD27. O anticorpo mais pode incluir a cadeia pesada CDR2 e/ou a cadeia leve CDR2 de anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5. O anticorpo mais pode incluir a cadeia pesada CDR1 e/ou a cadeia leve CDR1 de anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5.

Geração de anticorpos contendo sequências modificadas

Em outra modalidade, as sequências de região variável ou partes destes, da anticorpos anti-CD27 da invenção são modificadas para criar anticorpos anti-CD27 estruturalmente relacionadas que retêm a ligação (ou seja, para o mesmo epítipo que o anticorpo não modificado) e, assim, são funcionalmente equivalentes. Métodos para a identificação de resíduos que podem ser alterados sem remover a ligação de antígeno são bem conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Marks *et al.* (*Biotechnology* (1992) 10(7):779-83 (diversificação de anticorpos monoclonais por embaralhamento de regiões variáveis de cadeia leve, então as regiões variáveis de cadeia pesada com alterações de sequência CDR3 fixadas), Jaspers *et al.*(1994) *Biotechnology*

12(9):899-903 (seleção de anticorpos humanos de repertórios de apresentação de fagos a um epítopo simples de um antígeno), Sharon *et al.* (1986) *PNAS USA* 83(8): 2628-31 (mutagênese direcionada por sítio de um resíduo de aminoácido invariante na junção de segmentos de diversidade variável de um anticorpo); Casson *et al.* (1995) *J. Immunol.* 155(12):5647-54 (evolução de perda e alteração de especificidade resultando de mutagênese aleatória de uma região variável de cadeia pesada).

Assim, em um aspecto da invenção, as regiões CDR1, 2, e/ou 3 dos anticorpos projetados acima descritos pode incluir as sequências de aminoácido exata daquelas anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5 revelado aqui. No entanto, em outros aspectos da invenção, os anticorpos compreendem derivados de sequências CDR exatas de 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5 ainda retêm a capacidade de se ligar a CD27 efetivamente. Ditas modificações de sequências podem incluir um ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos, por exemplo, modificações de sequência conservadoras como descrito acima. As modificações de sequência podem ainda ser baseadas nas sequências consenso descritas acima para as sequências particulares CDR1, CDR2, e CDR3 de anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5.

Assim, em outra modalidade, o anticorpo projetado pode ser composto de uma ou mais CDRs que são, por exemplo, 90%, 95%, 98% ou 99,5% idêntica a uma ou mais CDRs de anticorpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8, e 1G5. Intervalos intermediários aos valores mencionados acima, por exemplo, CDRs que são 90-95%, 95-98%, ou 98-100% idêntico em identidade a uma ou mais sequências acima são ainda pretendidas por estar incluídas pela presente invenção.

Em outra modalidade, um ou mais resíduos de uma CDR podem ser alterados para modificar a ligação para obter uma on-rate de ligação favorecida, uma off-rate de ligação mais favorecida, ou ambos, de

modo que uma constante de ligação idealizada é obtida. Usando essa estratégia, um anticorpo contendo afinidade de ultra alta ligação de, por exemplo, 10^{10} M^{-1} ou mais, pode ser alcançado. As técnicas de maturação de afinidade, bem conhecidas na prática e aquelas descritas aqui, podem ser usadas para alterar as regiões de CDR seguido por triagem das moléculas de ligação resultantes para a alteração desejada na ligação. Assim, como CDR(s) são alteradas, alterações na afinidade de ligação bem como imunogenicidade podem ser monitoradas e classificadas de modo que um anticorpo otimizado para a melhor ligação combinada e baixa imunogenicidade são obtidas.

Além disso, ou por outro lado, modificações dentro de CDRs, modificações podem ainda ser preparados dentro de uma ou mais as regiões estruturais, FR1, FR2, FR3 e FR4, das regiões variáveis de cadeia pesada e/ou cadeia leve de um anticorpo, de modo que estas modificações não eliminam a afinidade de ligação do anticorpo. Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos de linhagem não germinativa nas regiões estruturais da região variável de cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo da invenção, é substituído com um resíduo de aminoácido de linhagem germinativa, ou seja, o resíduo correspondente de aminoácido na sequência de linhagem germinativa humana para a região variável de cadeia pesada ou leve, cujo o anticorpo tem identidade de sequência significativa com. Por exemplo, uma cadeia de anticorpo pode ser alinhada a uma cadeia de anticorpo em linhagem germinativa que este compartilha identidade de sequência com, e os resíduos de aminoácidos que não combinam entre sequência estrutural de anticorpo e a estrutura de cadeia de linhagem germinativa pode ser substituída com resíduos correspondentes a partir da sequência da linhagem germinativa. Quando um aminoácido difere entre uma região de estrutura variável de anticorpo e uma região de estrutura variável de sequência de linhagem germinativa humana equivalente, o aminoácido de estrutura de anticorpo poderia ser substituído pela sequência de aminoácido de linhagem

germinativa humana equivalente se este é esperado razoavelmente que o aminoácido cai dentro de uma das seguintes características:

(1) um resíduo de aminoácido que se liga não covalentemente ao antígeno diretamente,

5 (2) um resíduo de aminoácido que é adjacente a uma região CDR,

(3) um resíduo de aminoácido que, de outra forma, interage com uma região CDR (por exemplo, está dentro de cerca de 3-6 Å de uma região CDR como determinado por modelagem de computador), ou

10 (4) um resíduo de aminoácido que participa na interface VL-VH.

Os resíduos com “não covalentemente se liga a antígeno diretamente” incluem aminoácidos nas posições em regiões estruturais que têm uma boa probabilidade de interagir diretamente com aminoácidos no antígeno de acordo com forças químicas estabelecidas, por exemplo, por
15 ligação de hidrogênio, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, e semelhantes. Assim, em uma modalidade, um resíduo de aminoácido na região estrutural de um anticorpo da invenção é substituído com o resíduo de aminoácido de linhagem germinativa correspondente que se liga não
20 covalentemente ao antígeno diretamente.

Os resíduos que são “adjacentes a uma região CDR” incluem resíduos de aminoácido nas posições imediatamente adjacentes a uma ou mais CDRs na sequência primária do anticorpo, por exemplo, em posições imediatamente adjacentes a uma CDR como definido por Kabat, ou uma CDR
25 como definido por Chothia (*ver*, por exemplo, Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987)). Assim, em uma modalidade, um resíduo de aminoácido dentro da região estrutural de um anticorpo da invenção é substituído com um resíduo de aminoácido de linhagem germinativa que é adjacente a uma região CDR.

Os resíduos que “de outra forma interagem com uma região CDR” incluem aqueles que são determinados por análise estrutural secundária por ser em orientação especial suficiente para afetar uma região CDR. Ditos aminoácidos irão geralmente ter um átomo de cadeia lateral dentro de cerca de 3 unidades de angstrom (Å) de alguns átomos nas CDRs e devem conter um átomo que poderia interagir com os átomos de CDR de acordo com as forças químicas estabelecidas, como aquelas listas acima. Assim, em uma modalidade, um resíduo de aminoácido dentro da região estrutural de um anticorpo da invenção é substituído com um resíduo de aminoácido de linhagem germinativa correspondente que de outra forma interage com uma região CDR.

Os aminoácidos em várias posições na estrutura são conhecidos por serem importantes para a determinação de confirmação de CDR (por exemplo, capaz de interagir com os CDRs) em muitos anticorpos (Chothia and Lesk, *supra*, Chothia *et al.*, *supra* e Tramontano *et al.*, J. Mol. Biol. 215:175 (1990), todos dos quais são incorporados aqui por referência). Estes autores identificaram resíduos conservados estruturais importantes para conformação de CDR pela análise das estruturas de vários anticorpos conhecidos. Os anticorpos analisados estão dentro de um número limitado de classes estruturais ou “canônicas” baseadas na conformação de CDRs. Resíduos estruturais conservados dentro de membros de uma classe canônica como referenciado como um resíduo “canônico”. Resíduos canônicos incluem resíduos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 e 95 da cadeia leve e resíduos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 e 94 da cadeia pesada. Resíduos adicionais (por exemplo, resíduos determinantes de estrutura de CDR) podem ser identificados de acordo com a metodologia de Martin e Thorton (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800. Notavelmente, os aminoácidos nas posições 2, 48, 64 e 71 da cadeia leve e 26-30, 71 e 94 da cadeia pesada (numeração de acordo com Kabat) são conhecidos por serem capazes de interagir com os CDRs em

muitos anticorpos. Os aminoácidos nas posições 35 na cadeia leve e 93 e 103 na cadeia pesada também são propensos a interagir com os CDRs. Resíduos adicionais que podem afetar a conformação de CDRs podem ser identificados de acordo com a metodologia de Foote e Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487.

- 5 Ditos resíduos são chamados resíduos “vernier” e aquelas resíduos na região estrutural intimamente subjacente (ou seja, formando uma “plataforma” sob) as CDRs.

Os resíduos que “participam na interface VL-VH” ou “resíduos de empacotamento” incluem aqueles resíduos na interface entre VL
10 e VH como definido, por exemplo, por Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4592-66 (1985) ou Chothia *et al*, *supra*.

Ocasionalmente, há alguma ambiguidade sobre se um aminoácido particular está dentro de uma ou mais categorias acima mencionadas. Em ditos casos, são produzidos anticorpos variantes
15 alternativos, um dos quais tem essa substituição particular, o outro do qual não. Anticorpos variantes alternativos assim produzidos podem ser testados em qualquer um dos ensaios descritos para a atividade desejada e o anticorpo preferido selecionado.

Candidatos adicionais para substituição dentro da região
20 estrutural são aminoácidos que são não usuais ou “raros” para um anticorpo naquela posição. Estes aminoácidos podem ser substituídos com aminoácidos da posição equivalente da sequência de linhagem germinativa humana ou de posições equivalentes de anticorpos mais típicos. Por exemplo, a substituição pode ser desejável quando o aminoácido em uma região estrutural do
25 anticorpo é raro para aquela posição e o aminoácido correspondente na sequência de linhagem germinativa é comum para essa posição em sequências de imunoglobulina; ou quando o aminoácido no anticorpo é raro para aquela posição e o aminoácido correspondente na sequência de linhagem germinativa também é raro, em relação a outras sequências. É contemplado que por

substituição de um aminoácido incomum com um aminoácido da sequência de linhagem germinativa que acontece por ser típica para anticorpos, o anticorpo pode ser preparado menos imunogênico.

O termo “raro”, como usado aqui, indica um aminoácido ocorrendo naquela posição em menos do que cerca de 20%, preferencialmente menos do que cerca de 10%, mais preferencialmente menos do que cerca de 5%, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 3%, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 2% e ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 1% de sequências em uma amostra representativa de sequências, e o termo “comum”, como usado aqui, indica uma ocorrência de aminoácido em mais do que cerca de 25% mas geralmente mais do que cerca de 50% de sequências em uma amostra representativa. Por exemplo, todas as sequências de região variável de cadeia leve e pesada são respectivamente agrupadas em “subgrupos” de sequências que são especialmente homólogas a cada outra e têm os mesmos aminoácidos em certas posições críticas (Kabat *et al.*, *supra*). Quando decidindo se um aminoácido em uma sequência de anticorpo é “rara” ou “comum” entre sequências, esta irá geralmente ser preferencial para considerar somente aquelas sequências no mesmo subgrupo como a sequência de anticorpo.

Em geral, as regiões estruturais de anticorpos são geralmente substancialmente idênticas, e mais geralmente, idênticas as regiões estruturais das sequências de linhagem germinativa humana a partir da qual são derivadas. Claro, muitos dos aminoácidos na região estrutural fazem pouca ou nenhuma contribuição direta à especificidade ou afinidade de um anticorpo. Assim, muitas substituições conservadoras individuais dos resíduos estruturais podem ser toleradas sem alteração apreciável da especificidade ou afinidade de imunoglobulina resultante. Assim, em uma modalidade a região de estrutura variável do anticorpo compartilha pelo menos 85% de identidade de sequência a uma sequência de região estrutural variável de linhagem

germinativa humana ou consenso de ditas sequências. Em outra modalidade, a região de estrutura variável do anticorpo compartilha pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência a uma sequência de região estrutural variável de linhagem germinativa humana ou consenso de ditas sequências.

Além de simplesmente a ligação a CD27, um anticorpo pode ser selecionado para a retenção de outras propriedades funcionais de anticorpos da invenção, como, por exemplo:

(1) inibe (por exemplo, bloqueia completamente ou parcialmente) ligação de CD70 a células que expressam CD27 em pelo menos cerca de 70%;

(2) liga a CD27 humano com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10^{-9} M ou menos, ou alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10^{+9} M⁻¹ ou mais

(3) induz pelo menos cerca de 40% citotoxicidade mediada por complemento (CDC) de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml; e/ou

(4) induz pelo menos cerca de 40% de lise específica mediada por ADCC de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml.

Caracterização de anticorpos monoclonais para CD27

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser caracterizados por se ligar a CD27, utilizando uma variedade de técnicas conhecidas. Geralmente, os anticorpos são inicialmente caracterizados por ELISA. Resumidamente, placas de microtitulação podem ser revestidas com CD27 purificado em PBS, e depois bloqueadas com proteínas irrelevantes, como albumina de soro bovino (BSA) diluído em PBS. As diluições do plasma de camundongos imunizados com CD27 são adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas a 37°C. As placas são lavadas com PBS/Tween

20 e depois incubadas com um reagente policlonal anti-IgG humano de cabra específico para Fc conjugado com fosfatase alcalina, durante 1 hora a 37°C. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato ABTS, e analisadas em OD de 405. Preferencialmente, os camundongos que desenvolvem os títulos mais elevados serão utilizados para as fusões.

Um ensaio de ELISA, como descrito acima pode ser usado para triar anticorpos e, assim, os hibridomas que produzem anticorpos que apresentam reatividade positiva com o imunogênio CD27. Os hibridomas que se ligam, preferencialmente com uma elevada afinidade, a CD27 pode então ser subclonados e ainda caracterizados. Um clone de cada hibridoma, que retém a reatividade das células parentais (por ELISA), pode então ser escolhido para fazer um banco de células, e para a purificação de anticorpos.

Para purificar anticorpos anti-CD27, os hibridomas selecionados podem ser cultivados em frascos rotativos, de dois litros frascos rotatórios ou outros sistemas de cultura. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar a proteína. Após a troca de tampão de PBS, a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ utilizando 1,43 de coeficiente de extinção ou preferencialmente por análise nefelométrica. IgG pode ser verificada por electroforese em gel e por método de antígeno específico.

Para determinar se os anticorpos monoclonais anti-CD27 selecionados se ligam a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado utilizando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, IL). A ligação a MAb biotinilado pode ser detectada com uma sonda de estreptavidina marcada. Para determinar o isotipo de anticorpos purificados, ELISAs isotipo podem ser realizados utilizando técnicas reconhecidas na prática. Por exemplo, os poços de placas de microtitulação podem ser revestidos com 10 µg/ml de anticorpos anti-Ig durante a noite a 4°C. Após

bloqueio com BSA a 5%, as placas são reagidas com 10 µg/ml de anticorpos monoclonais ou controles de isotipo purificados, em temperatura ambiente durante duas horas. Os poços podem em seguida ser reagidos com IgG1 ou outras sondas conjugadas específicas de isotipos. As placas são desenvolvidas e analisadas como descrito acima.

Para testar a ligação dos anticorpos monoclonais para células vivas que expressam CD27, citometria de fluxo pode ser usada. Resumidamente, as linhagens de células, e/ou PBMCs que expressam CD27 ligado à membrana (cultivadas sob condições de crescimento padrões) são misturadas com várias concentrações de anticorpos monoclonais em PBS contendo 0,1% de BSA a 4°C por 1 hora. Após lavagem, as células são reagidas com anticorpo marcado com fluoresceína-anti-IgG de acordo com as mesmas condições que a manchamento do anticorpo primário. As amostras podem ser analisadas por instrumento de FACScan utilizando luz e propriedades de dispersão lateral para registrar em células individuais e a ligação dos anticorpos marcados é determinada. Um ensaio alternativo utilizando microscopia de fluorescência pode ser utilizado (além de ou em vez de) o ensaio de citometria de fluxo. As células podem ser coradas exatamente como descrito acima e examinadas por microscopia de fluorescência. Este método permite a visualização de células individuais, mas pode diminuir a sensibilidade, dependendo da densidade do antígeno.

IgGs anti-CD27 podem ser ainda testados para a reatividade com o antígeno CD27 por Western blotting. Resumidamente, os extratos celulares a partir de células que expressam CD27 podem ser preparados e submetidos a eletroforese em gel de dodecil sulfato de poliacrilamida. Após a eletroforese, os antígenos separados serão transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro de camundongo a 20%, e sondados com os anticorpos monoclonais a serem testados. A ligação de IgG pode ser detectada utilizando anticorpo anti-IgG fosfatase alcalina e desenvolvido com

comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Os métodos para a análise de afinidade de ligação, reatividade cruzada, e cinética de ligação de vários anticorpos anti-CD27 incluem ensaios padrão conhecidos na técnica, por exemplo, análise de ressonância de plasmon de superfície Biacore™ (SPR), utilizando um instrumento de Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suécia), como descrito no Exemplo 2 aqui.

II. Imunotoxinas

Em outra modalidade, os anticorpos da presente invenção estão ligados a uma fração terapêutica, como uma citotoxina, uma droga ou um radioisótopo. Quando conjugado com uma citotoxina, estes conjugados de anticorpos são referidos como “imunotoxinas”. Uma citotoxina ou agente citotóxico, inclui qualquer agente que seja prejudicial para (por exemplo, mata) células. Os exemplos incluem taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi antracinaadiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e seus análogos ou homólogos dos mesmos. Os agentes terapêuticos incluem, entre outros, anti-metabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclina (por exemplo, daunorubicina (antigamente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (antigamente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitótico (por exemplo, vincristina e vinblastina). Um anticorpo da presente invenção pode ser

conjugado com um radioisótopo, por exemplo, iodo radioativo, para gerar radiofármacos citotóxicos para o tratamento de um distúrbio relacionado com dendrítica, como uma doença autoimune ou inflamatória, ou doença de enxerto versus hospedeiro.

5 O anticorpo conjugado da invenção pode ser usado para modificar uma determinada resposta biológica, e a fração de droga não deve ser interpretada como limitado a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a fração de droga pode ser uma proteína ou polipeptídeo possuindo uma atividade biológica desejada. Ditas proteínas podem incluir, por
10 exemplo, uma toxina enzimativamente ativa ou fragmento ativo do mesmo, como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina, ou toxina diftérica; uma proteína como fator de necrose tumoral ou interferon- γ ; ou, modificadores de resposta biológica como, por exemplo, linfocinas, interleucina-1 (“IL-1”), interleucina-2 (“IL-2”), interleucina-6 (“IL-6”), fator estimulantes de colônia
15 de macrófago macrogranulócito (“GM-CSF”), fator estimulador de colônia de granulócito (“G-CSF”), ou outros fatores de crescimento.

As técnicas para conjugação de dita fração terapêutica de anticorpos são bem conhecidas, ver, por exemplo, Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in
20 Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery”, em Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, em Monoclonal Antibodies '84:
25 Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, em Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe et al., “The Preparation And Cytotoxic

Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

III. Composições

Em outra modalidade, a presente invenção fornece uma
5 composição, por exemplo, uma composição, que contém um ou uma
combinação de anticorpos monoclonais da presente invenção, formulados
juntamente com um carreador (por exemplo, um carreador farmacologicamente
aceitável). As composições contendo moléculas biespecíficas que
compreendem um anticorpo da presente invenção são também fornecidas. Em
10 uma modalidade, as composições incluem uma combinação de vários (por
exemplo, dois ou mais) anticorpos isolados da presente invenção.
Preferencialmente, cada um dos anticorpos da composição se liga a um
diferente epítipo pré-selecionado de CD27.

As composições farmacêuticas da invenção também podem ser
15 administradas em terapia de combinação, ou seja, combinadas com outros
agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição
da presente invenção com pelo menos um ou mais agentes terapêuticos
adicionais, como agentes anti-inflamatórios, DMARDs (drogas
antirreumáticas modificadoras da doença), agentes imunossuppressores, e
20 quimioterápicos. As composições farmacêuticas da presente invenção podem
também ser administradas em conjunto com a terapia de radiação. A
coadministração com outros anticorpos também é incluída pela presente
invenção.

Como usado aqui, os termos “carreador” e “carreador
25 farmacologicamente aceitável” inclui qualquer e todos os solventes, dispersão,
meio, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes
isotônicos e retardantes de absorção, e semelhantes que são fisiologicamente
compatíveis. Preferencialmente, o carreador é adequado para administração
intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral espinhal ou epidérmica

(por exemplo, por injeção ou infusão). Dependendo da via de administração, o composto ativo, ou seja, anticorpo, molécula biespecífica e multiespecíficas, pode ser revestido em um material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que podem inativar o composto.

5 Exemplos de adjuvantes que podem ser utilizados com os anticorpos e as construções da presente invenção incluem: Adjuvante Incompleto de Freund e Adjuvante Completo e (Difco Laboratories, Detroit, Michigan); Adjuvante Merck 65 (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); sais de alumínio, como gel de
10 hidróxido de alumínio (alum) ou fosfato de alumínio, sais de ferro, cálcio ou zinco, uma suspensão insolúvel de tirosina acilada; açúcares acilados; cationicamente ou anionicamente polissacarídeos derivatizados; polifosfazenos; microesferas biodegradáveis, citocinas, como GM-CSF, interleucina-2, -7, -12 e outros fatores semelhantes, 3D-MPL;
15 oligonucleotídeo CpG, e monofosforil-lipídeo A, por exemplo, 3-de-O-acilado monofosforil lipídeo A.

 Adjuvantes MPL estão disponíveis a partir de Corixa Corporation (Seattle, Wash, ver, por exemplo, Patentes US 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 e 4.912.094). Oligonucleotídeos contendo CpG (nos
20 quais o dinucleotídeo CpG é não metilado) são bem conhecidos e estão descritos, por exemplo, em WO 96/02555, WO 99/33488 e Patentes US 6.008.200 e 5.856.462. As sequências de DNA imunoestimulanteas são também descritos, por exemplo, por Sato et al., Science 273:352, 1996.

 Outros adjuvantes alternativos incluem, por exemplo,
25 saponinas, como Quil A, ou seus derivados, incluindo QS21 e QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; digitonina, ou Gypsophila ou saponinas de Chenopodium quinoa; Montanide ISA 720 (Seppic, França); SAF (Chiron, Califórnia, Estados Unidos); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), a série SBAS de adjuvantes (por exemplo, SBAS-2 ou

SBAS-4, disponível a partir de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica); Detox (EnhanzynTM) (Corixa, Hamilton, Mont.); RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) e outros aminoalquil glucosaminida 4-fosfatos (AGP); adjuvantes de éter de polioxietileno, como aqueles descritos em WO 99/52549A1, imidazoquinolinas sintéticas, como imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison, et al., Vaccine 19: 1820-1826, 2001, e resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., Cellular immunology 204: 64-74, 2000; bases de Schiff de carbonilas e aminas que são constitutivamente expressas em célula apresentadora de antígeno e superfícies de células T, como tucaresol (Rhodes, J. et al., Nature 377: 71-75, 1995); citocina, quimiocina e moléculas co-estimulantes como proteína ou peptídeo, incluindo, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias como Interferon, GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa e TGF-beta, indutores de Th1 como interferon gama, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, indutores de Th2 como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e outra quimiocina e genes co-estimulantes como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 e CD40L; ligantes direcionados por imunoestimulantes como CTLA-4 e L-selectina, proteínas estimulantes de apoptose e peptídeos como Fas; adjuvantes baseados em lipídeos sintéticos, como vaxfectina, (Reyes et al., Vaccine 19: 3778-3786, 2001) esqualeno, alfa-tocoferol, polissorbato 80, DOPC e colesterol; endotoxina, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); ligantes que disparam receptores Toll para produzir citocinas indutoras de Th1, como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, proteína micobacteriana p19, peptidoglicano, ácido teicoico e o lipídeo A, e CT (toxina da cólera, subunidades A e B) e LT (enterotoxina termolábil de E. coli, subunidades A e B), família de proteína de choque de calor (HSPs), e LLO (listeriolisina O; WO 01/72329). Estas e vários outros agonistas de Receptor tipo Toll (TLR) são descritos, por exemplo, em Kanzler et al, *Nature Medicine*, May 2007, Vol. 13, N.º 5. Um agente imunoestimulante preferencial para utilização em

combinação com um anticorpo anti-CD27 da presente invenção é um agonista de TLR3, como Poly IC.

Um “sal farmaceuticamente aceitável” refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do composto parente e não confere qualquer efeito toxicológico indesejado (ver, por exemplo, Berge, S.M., *et al.* (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Exemplos de ditos sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Os sais de adição de ácidos incluem os derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforosos e semelhantes, bem como a partir de ácidos orgânicos não tóxicos como ácidos alifáticos mono-e dicarboxílicos, ácidos alcanoicos fenil-substituídos, ácidos hidroxi alcanoicos, ácidos aromáticos, alifáticos e ácidos sulfônicos aromáticos e semelhantes. Os sais de adição de base incluem os derivados de metais alcalinos terrosos, como sódio, potássio, magnésio, cálcio semelhantes, bem como a partir de aminas orgânicas não tóxicas, como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e semelhantes.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado por um especialista na técnica, a via e/ou modo de administração irão variar dependendo dos resultados desejados. Os compostos ativos podem ser preparados com veículos que protegerão o composto contra a liberação rápida, como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, adesivos transdérmicos e sistemas de liberação microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizados, como etileno-acetato de vinil, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres e ácido polilático. Muitos métodos para a preparação de ditas formulações são patenteados ou geralmente conhecido pelos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R.

Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Para administrar um composto da presente invenção por determinadas vias de administração, pode ser necessário revestir o composto com, ou coadministrar o composto com, um material para prevenir a sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um indivíduo em um carreador apropriado, por exemplo, lipossomas, ou um diluente. Diluentes aceitáveis incluem soluções tampão salinas e aquosas. Os lipossomas incluem emulsões CGF água-em-óleo-em-água bem como lipossomas convencionais (Strejan et al. (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Os carreadores incluem soluções aquosas estéreis ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções injetáveis estéreis ou dispersões. A utilização de ditos meios e agentes para substâncias farmacologicamente ativas é conhecida na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional é incompatível com o composto ativo, a sua utilização nas composições farmacêuticas da presente invenção está contemplada. Os compostos ativos suplementares podem também ser incorporados nas composições.

As composições terapêuticas devem ser tipicamente estéreis e estáveis sob as condições de produção e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada apropriada para concentração de droga elevada. O carreador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e suas misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de surfactantes. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, polióis como o manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das

composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais monoestearatos e gelatina.

As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o composto ativo na quantidade necessária, em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido de esterilização por microfiltração. Geralmente, as dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes necessários de entre os enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferenciais de preparação são secagem por vácuo e liofilização (liofilização), que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração .

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta ideal desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um único bolus pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada, como indicado pelas exigências da situação terapêutica. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem ser administrados uma vez ou duas vezes por semana por injeção subcutânea ou intramuscular ou uma vez ou duas vezes por mês por injeção subcutânea ou intramuscular.

É especialmente vantajoso formular composições parenterais em uma forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma unitária de dosagem como usada aqui refere-se a unidades fisicamente discretas como dosagens unitárias para os indivíduos a serem tratados, cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carreador farmacologicamente requerido. A especificação para as formas de dosagem unitárias da invenção

são ditadas por e diretamente dependentes de (a) as características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de manipular dito um composto ativo para o tratamento da sensibilidade nos indivíduos.

5 Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes, (2) antioxidantes solúveis em óleo, como palmitato de ascorbil, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato
10 de propil, alfa-tocoferol, e semelhantes, e (3) agentes quelantes de metais, como ácido cítrico, ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e semelhantes.

 Para as composições terapêuticas, as formulações da presente invenção incluem aquelas apropriadas para administração oral, nasal, tópica
15 (incluindo bucal e sublingual), retal vaginal e/ou administração parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas na forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na técnica farmacêutica. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material carreador para produzir uma forma de dosagem única irá variar
20 dependendo do indivíduo a ser tratado, e o modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material de suporte para produzir uma forma de dosagem individual será geralmente a quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, fora dos cem por cento, esta quantidade irá variar entre cerca de 0,001 por cento a
25 cerca de noventa por cento de ingrediente ativo, preferencialmente de cerca de 0,005 por cento até cerca de 70 por cento, mais preferencialmente, entre cerca de 0,01 por cento a cerca de 30 por cento.

 As formulações da presente invenção que são adequadas para administração vaginal incluem também pessários, tampões, cremes, géis,

pastas, espumas ou formulações spray contendo ditos carreadores como são conhecidos na técnica como sendo apropriados. Formas de dosagem para administração tópica ou transdérmica de composições da presente invenção incluem pós, sprays, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, adesivos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um veículo farmacêuticamente aceitável, e com quaisquer conservantes, tampões, ou propulsores que possam ser necessários.

As frases “administração parenteral” e “administrado parenteralmente” como usadas aqui significam modos de administração além da administração enteral e tópica, geralmente por injeção, e inclui, entre outras, administração intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal e infusão.

Exemplos de carreadores aquosos ou não aquosos que podem ser utilizados nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, poliois (como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e semelhantes), e suas misturas adequadas, óleos vegetais, como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, como oleato de etila. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de materiais de revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersões e pela utilização de surfactantes.

Estas composições podem também conter adjuvantes como conservantes, agentes molhantes, agentes emulsionantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser garantida pelos procedimentos de esterilização, supra, e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico fenol, e semelhantes. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, como açúcares, cloreto de sódio, semelhantes nas composições.

Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que retardam a absorção tais como monoestearato de alumínio e gelatina.

Quando os compostos da presente invenção são administrados
5 como produtos farmacêuticos, a seres humanos e animais, podem ser administrados isoladamente ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,001 a 90% (mais preferencialmente, 0,005 a 70%, como 0,01 a 30%) de ingrediente ativo em combinação com um carreador farmaceuticamente aceitável.

10 Independentemente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção, que pode ser utilizada em uma forma hidratada adequada, e/ou, as composições farmacêuticas da presente invenção, são formuladas em formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis por métodos convencionais conhecidos pelos especialistas na
15 técnica.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja efetivo para alcançar a resposta terapêutica desejada para um paciente em particular, composição e
20 modo de administração, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a atividade de farmacocinética das composições particulares da presente invenção utilizada, ou seu éster, sal ou amida, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular a ser utilizado, a duração do
25 tratamento, outras drogas, compostos, e/ou materiais utilizados em combinação com as composições particulares empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente a ser tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos na técnica médicas. Um médico ou veterinário especialista na técnica pode facilmente determinar e

prescrever a quantidade efetiva da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou veterinário poderia começar com doses dos compostos da invenção empregados na composição farmacêutica a níveis mais baixos do que o requerido, a fim de obter o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado. Em geral, uma dose diária adequada de uma composição da presente invenção será a quantidade do composto que é a dose efetiva mais baixa para produzir um efeito terapêutico. Dita dose efetiva dependerá geralmente de fatores descritos acima. É preferencial que a administração seja por via intravenosa, intramuscular, intraperitoneal ou subcutânea, preferencialmente administrada próxima ao local do alvo. Se desejado, a dose diária efetiva de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas, três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriados ao longo do dia, opcionalmente, em formas de dosagem unitárias. Embora seja possível para um composto da presente invenção ser administrado sozinho, é preferencial administrar o composto como uma formulação farmacêutica (composição).

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, em uma modalidade preferencial, uma composição terapêutica da presente invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção sem agulha hipodérmica, como os dispositivos descritos nas Patentes US 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, ou 4.596.556. Exemplos de implantes bem conhecidos e módulos úteis na presente invenção incluem: Patente US 4.487.603, que revela uma bomba de microinfusão implantável para a distribuição de medicação em uma taxa controlada; Patente US 4.486.194, que revela um dispositivo terapêutico para administração de medicamentos através da pele; Patente US 4.447.233, que revela uma bomba de infusão de medicamento para a liberação de medicamentos, em uma taxa

de infusão precisa; Patente US 4.447.224, que revela um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para a liberação contínua de droga; Patente US 4.439.196, que revela um sistema de liberação osmótica de droga possuindo compartimentos de multi-câmaras, e Patente US 4.475.196, que revela um sistema de liberação osmótica de droga. Muitos outros implantes, sistemas de liberação, e módulos são bem conhecidos aos especialistas na técnica.

Em certas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser formulados para assegurar uma distribuição apropriada *in vivo*. Por exemplo, a barreira sangue-cérebro (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção atravessem a BBB (se desejado), podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para os métodos de produção de lipossomas, ver, por exemplo, patentes US 4.522.811; 5.374.548, e 5.399.331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais unidades que são seletivamente transportadas em células ou órgãos específicos, assim, melhoram a liberação de drogas específicas (ver, por exemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Exemplos de frações de direcionamento incluem folato ou biotina (ver, por exemplo, Patente US 5.416.016 para Low et al.); manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticorpos (P. G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180), receptor A de proteína surfactante (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134), espécies diferentes das quais pode compreender as formulações das invenções, assim como componentes das moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); ver ainda K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. Em uma modalidade da invenção, os compostos terapêuticos da invenção são formulados em lipossomas, em uma modalidade mais preferencial, os lipossomas incluem uma fração de direcionamento. Em uma modalidade mais

preferencial, os compostos terapêuticos em que os lipossomas são liberados por injeção de bolus a um local proximal ao tumor ou infecção. A composição deve ser fluida na medida em que existe seringabilidade fácil. Deve ser estável sob as condições de produção e armazenamento e deve ser preservada
5 contra a ação contaminante de micro-organismos como bactérias e fungos.

A capacidade de um composto para inibir o câncer pode ser avaliada em um sistema de modelo animal preditivo de eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada examinando a capacidade do composto para inibir, dita inibição *in*
10 *vitro* por ensaios conhecidos aos especialistas na técnica. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor, ou de outra forma melhorar os sintomas em um indivíduo. Um especialista na técnica seria capaz de determinar ditas quantidades com base em ditos fatores como o tamanho do indivíduo, a gravidade dos sintomas do
15 indivíduo, e a composição particular ou a via de administração selecionada.

A composição deve ser estéril e fluida, na medida em que a composição é liberada por meio de seringa. Além da água, o carreador pode ser uma solução salina tamponada isotônica, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol, e polietilenoglicol líquido, e semelhantes), e suas
20 misturas adequadas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, através da utilização de um revestimento como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de surfactantes. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois como o manitol ou sorbitol, e cloreto de
25 sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser conseguida incluindo na composição um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais monoestearatos e gelatina.

Quando o composto ativo é adequadamente protegido, como descrito acima, o composto pode ser administrado por via oral, por exemplo,

com um diluente inerte ou um transportador comestível assimilável.

IV. Usos e métodos da presente invenção

Em uma modalidade, os anticorpos, moléculas biespecíficas, e as composições da presente invenção podem ser utilizadas para tratar e/ou
5 evitar (por exemplo, imunização contra) uma variedade de doenças e condições.

Uma das indicações da doença primária que pode ser tratada é um câncer. Em particular, um anticorpo anti-CD27, que induz ou aumenta uma resposta imune pode ser utilizada no tratamento de câncer. Tipos de
10 câncer incluem, entre outros, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica promielocítica mieloblastos, leucemia crônica, leucemia mielocítica crônica (granulocítica), leucemia linfocítica crônica, linfoma de célula de manta, linfoma de sistema nervoso central primário, linfoma de Burkitt, linfoma de célula B de zona marginal,
15 Policitemia vera Linfoma, doença de Hodgkin, doença não Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, tumores sólidos, sarcomas, e carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, crondrosarcoma, sarcoma osteogênico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma,
20 linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, sarcoma de cólon, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma de célula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma
25 papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma de duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de célula pequena, carcinoma pulmonar de célula não

pequena, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngea, carcinoma

5 esofágico, carcinoma de célula basal, câncer de trato biliar, câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de sistema nervoso central e cérebro (CNS), câncer cervical, coriocarcinoma, cânceres colorretal, câncer de tecido conectivo, câncer de sistema digestivo, câncer endometrial, câncer esofágico, câncer de

10 olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, neoplasma intraepitelial, câncer renal, câncer de laringe, câncer hepático, câncer pulmonar (célula pequena, célula grande), melanoma, neuroblastoma; câncer da cavidade oral (por exemplo, lábio, língua, boca e faringe), câncer ovariano, câncer pancreático, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, câncer retal; câncer do

15 sistema respiratório, sarcoma, câncer de pele, câncer de estômago, câncer testicular, câncer tireoide, câncer uterino, e câncer do sistema urinário. Cânceres preferenciais incluem tumores que expressam CD27 selecionados do grupo que consiste em por leucemia linfocítica crônica, linfoma de células do manto, linfoma primário de sistema nervoso central, linfoma de Burkitt e linfoma de célula B de zona marginal.

20 Outras indicações de doenças para uso de um anticorpo anti-CD27, que induz ou aumenta uma resposta imune incluem doenças infecciosas bacterianas, fúngicas, virais e parasitárias. Outras indicações de doenças para uso de um anticorpo anti-CD27, que inibe ou reduz a resposta imune incluem a rejeição do enxerto, doenças autoimunes e alergias.

25 Doenças autoimunes exemplares incluem, entre outras, esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes tipo 1, psoríase, doença de Crohn e outras doenças intestinais inflamatórias como colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), encefalomielite autoimune, miastenia gravis (MG), tireoidite de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pênfigo, doença de

Graves, anemia hemolítica autoimune, purpura trombocitopênica autoimune, escleroderma com anticorpos anti-colágeno, doença de tecido conectivo misto, polipiosite, anemia perniciosa, doença de Addison idiopática, infertilidade associada a autoimune, glomerulonefrite, glomerulonefrite
5 crescente, glomerulonefrite proliferativa, pênfigo bolhoso, síndrome de Sjogren, artrite psoriática, resistência a insulina, diabetes mellitus autoimune, hepatite autoimune, hemofilia autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS), hepatite autoimune, hemofilia autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune, uveoretinite autoimune, síndrome de Guillain-
10 Bare, arteriosclerose e doença de Alzheimer. Exemplos de distúrbios alérgicos incluem, entre outros, conjuntivite alérgica, conjuntivite vernal, queratoconjuntivite vernal, e conjuntivite papilar gigante; distúrbios alérgicos nasais, incluindo rinite alérgica e sinusite; distúrbios alérgicos óticos, incluindo prurido tubo Eustáquio; distúrbios alérgicos da parte superior e
15 inferior das vias aéreas, incluindo asma intrínseca e extrínseca; distúrbios alérgicos da pele, incluindo eczema, dermatite e urticária, e distúrbios alérgicos do trato gastrointestinal.

Em outro aspecto, um anticorpo da presente invenção é administrado em combinação com uma vacina, para aumentar a resposta
20 imunitária contra o antígeno da vacina, por exemplo, um antígeno de tumor (para deste modo aumentar a resposta imune contra o tumor), ou um antígeno de um patógeno de doença infecciosa (para, assim, aumentar a resposta imune contra o agente patogênico de doença infecciosa). Assim, nesta modalidade, um antígeno de vacina pode compreender, por exemplo, um antígeno ou
25 composição antigênica capaz de induzir uma resposta imune contra um tumor ou contra um patógeno de doença infecciosa como vírus, bactéria, parasita ou fungo. O antígeno ou antígenos podem ser, por exemplo, peptídeos/proteínas, polissacarídeos, e/ou lipídeos. O antígeno ou antígenos derivados de tumores, como os vários antígenos tumorais aqui descritos anteriormente.

Alternativamente, o antígeno ou antígenos podem ser derivados de patógenos, como vírus, bactérias, parasitas e/ou fungos, como os antígenos de vários patógenos anteriormente aqui descritos. Outros exemplos de antígenos de patógenos apropriados incluem, entre outros, os seguintes:

- 5 Antígenos virais ou determinantes antigênicos podem ser derivados a partir de, por exemplo: Citomegalovírus (especialmente humana, como gB ou seus derivados); Vírus Epstein Barr (como gp350); flavivírus (por exemplo vírus da febre amarela, vírus da Dengue, vírus de encefalite transmitida por carrapato, vírus da encefalite japonesa); vírus de hepatite, 10 como o vírus da hepatite B (por exemplo antígeno de superfície de hepatite B como PreS1, PreS2 e S antígenos descritos em EP-A-414 374; 578 EP-A-0304 e 198474-EP-A), vírus da hepatite A, vírus da hepatite C e vírus da hepatite E; HIV-1, (como tat, nef, gpl20 ou gpl60); vírus do herpes humano, como gD ou seus derivados ou proteína de início imediato como ICP27 de 15 HSV1 ou HSV2; vírus do papiloma humano (por exemplo HPV6, 11, 16, 18); Vírus da gripe (vírus inteiro ou inativado, vírus de influenza split, cultivados em ovos ou células MDCK, ou células Vero ou virossomas de gripe completos (como descrito por Gluck, Vaccine, 1992,10, 915-920) ou proteínas recombinantes ou purificadas, como proteínas, NP, NA, HA ou M); 20 vírus do sarampo; vírus da caxumba; vírus parainfluenza; vírus da raiva; Vírus sincicial respiratório (como proteínas de F e G); rotavírus (incluindo vírus atenuados vivo); vírus da varíola; Vírus de Varicela Zoster (como gpI, II e IE63); e os vírus HPV responsáveis pelo câncer de colo uterino (por exemplo as proteínas precoces E6 ou E7 em fusão com um carreador de 25 proteína D para formar fusões de proteína D-E6 ou E7 de HPV 16, ou combinações destes; ou combinações de E6 ou E7 com L2 (ver por exemplo WO 96/26277).

Antígenos bacterianos ou determinantes antigênicos podem ser derivados de, por exemplo: *Bacillus* spp., incluindo *B. anthracis* (por

exemplo, a toxina botulínica); *Bordetella* spp, incluindo *B. pertussis* (por exemplo pertactina, toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fimbriae); *Borrelia* spp., incluindo *B. burgdorferi* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por exemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Campylobacter* spp, incluindo *C. jejuni* (por exemplo, toxinas, adesinas e invasinas) e *C. coli*; *Chlamydia* spp., incluindo *C. trachomatis*, (por exemplo, MOMP, proteínas de ligação de heparina), *C. pneumoniae* (por exemplo, MOMP, proteínas de ligação de heparina), *C. psittaci*; *Clostridium* spp., incluindo *C. tetani* (como toxina tetânica), *C. botulinum* (por exemplo toxina botulínica), *C. difficile* (por exemplo, toxinas clostridium A ou B); *Corynebacterium* spp., incluindo *C. diphtheriae* (por exemplo, diphtheria toxin); *Ehrlichia* spp., incluindo *E. equi* e o agente de Ehrlichiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia* spp, incluindo *R. rickettsii*; *Enterococcus* spp., incluindo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Escherichia* spp, incluindo enterotóxico *E. coli* (por exemplo, fatores de colonização, toxina lábil a calor ou derivados da mesma, ou uma toxina estável ao calor), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogênica (por exemplo, toxina tipo toxina shiga); *Haemophilus* spp., incluindo *H. influenzae* tipo B (por exemplo, PRP), *H. influenzae* sem tipo, por exemplo OMP26, adesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D e lipoproteína D, e fimbrina e peptídeos derivados de fimbrina (ver por exemplo US 5.843.464); *Helicobacter* spp, incluindo *H. pylori* (por exemplo, urease, catalase, toxina vacuolating); *Pseudomonas* spp, incluindo *P. aeruginosa*; *Legionella* spp, incluindo *L. pneumophila* ; *Leptospira* spp., incluindo *L. interrogans*; *Listeria* spp., incluindo *L. monocytogenes*; *Moraxella* spp, incluindo *M. catarrhalis*, também conhecido como *Branhamella catarrhalis* (por exemplo, adesinas e invasinas de alto e baixo peso molecular); *Moraxella Catarrhalis* (incluindo vesículas de membrana externa da mesma, e OMP106 (ver, por exemplo

W097/41731)); *Mycobacterium* spp., incluindo *M. tuberculosis* (por exemplo, ESAT6, antígeno 85A, -B or -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Neisseria* spp, incluindo *N. gonorrhea* e *N. meningitidis* (por exemplo, polissacarídeos capsulares e conjugados dos
5 mesmos, proteínas de ligação a transferrina, proteínas de ligação a lactoferrina, PilC, adesinas); *Neisseria meningitidis* B (incluindo vesículas de membrana externa, e NspA (ver por exemplo WO 96/29412); *Salmonella* spp, incluindo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Shigella* spp, incluindo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Staphylococcus* spp.,
10 incluindo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Streptococcus* spp, incluindo *S. pneumoniae* (por exemplo, polissacarídeos capsulares e conjugados dos mesmos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de ligação a colina) e o antígeno de proteína Pneumolysin (Biochem Biophys Acta, 1989,67,1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25,337-342), e derivados detoxificado
15 do mesmo (ver, por exemplo WO 90/06951; WO 99/03884); *Treponema* spp., incluindo *T. pallidum* (por exemplo, as proteínas de membrana externa), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Vibrio* spp, incluindo *V. cholera* (por exemplo, toxina colérica); e *Yersinia* spp, incluindo *Y. enterocolitica* (por exemplo, uma proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.

20 Antígenos parasitários/fúngicos ou determinantes antigênicos podem ser derivados a partir de, por exemplo: *Babesia* spp., incluindo *B. microti*; *Candida* spp., incluindo *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., incluindo *C. neoformans*; *Entamoeba* spp., incluindo *E. histolytica*; *Giardia* spp., incluindo
; *G. lamblia*; *Leshmania* spp., incluindo *L. major*; *Plasmodium*. *faciparum*
25 (MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Sequestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXPI, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 e seus análogos em *Plasmodium* spp.); *Pneumocystis* spp., incluindo *P. ;carinii*; *Schistosoma* spp., incluindo *S. mansoni*; *Trichomonas* spp., incluindo *T. vaginalis*; *Toxoplasma* spp., incluindo *T.*

gondii (por exemplo, SAG2, SAG3, Tg34); Trypanosoma spp., incluindo T. cruzi.

Será apreciado, que em conformidade com esse aspecto da presente invenção, antígenos e determinantes antigênicos podem ser usados em muitas formas diferentes. Por exemplo, antígenos ou determinantes antigênicos podem estar presentes como proteínas ou peptídeos isolados (por exemplo, nas chamadas “subunidades de vacina”) ou, por exemplo, como antígenos ou determinantes antigênicos associados a células ou associados a vírus (por exemplo, em cepas patogênicas vivas ou mortas). Patógenos vivos serão preferencialmente atenuados de maneira conhecida. Alternativamente, antígenos ou determinantes antigênicos podem ser gerados *in situ* no indivíduo pelo uso de um polinucleotídeo codificando para um antígeno ou determinante antigênico (como o assim chamado “vacinação de DNA”), embora seja apreciado que os polinucleotídeos que podem ser usados com esta abordagem não sejam limitados ao DNA, e podem ainda incluir RNA e polinucleotídeos modificados como discutido acima.

Em uma modalidade, um antígeno de vacina pode também ser alvo, por exemplo, a tipos de célula específica ou tecidos específicos. Por exemplo, o antígeno da vacina pode ser direcionado para células apresentadoras de antígeno (APCs), por exemplo, pelo uso de agentes como anticorpos direcionados para receptores de superfície de APC como DEC-205, por exemplo, como discutido em WO 2009/061996 (Celldex Therapeutics, Inc) ou o Receptor de manose (CD206), por exemplo, como discutido em WO 03040169 (Medarex Inc).

Para uso em terapia, os anticorpos da invenção podem ser administrados a um indivíduo diretamente (ou seja, *in vivo*), sozinho ou com outras terapias como uma terapia de agente imunoestimulante, uma vacina, quimioterapia ou radioterapia. Em todos os casos, os anticorpos, biespecíficos, composições e agentes imunoestimulantes e outras terapias são

administradas em quantidade efetiva para exercer seu efeito terapêutico desejado. O termo “quantidade efetiva” refere-se àquela quantidade necessária ou suficiente para realizar um efeito biológico desejado. Por exemplo, uma quantidade efetiva poderia ser aquela quantidade necessária para eliminar um tumor, câncer ou infecção bacteriana, viral ou fúngica. A quantidade efetiva para qualquer aplicativo específico pode variar dependendo de ditos fatores como a doença ou condição a ser tratada, o anticorpo específico sendo administrado, o tamanho do indivíduo, ou a gravidade da doença ou condição. Um especialista na técnica pode empiricamente determinar a quantidade efetiva de uma molécula particular sem necessitando de experimentação indevida.

Vias preferenciais de administração para vacinas incluem, por exemplo, injeção (por exemplo, subcutânea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal). A invenção pode ser em bolus ou uma infusão contínua. Outras vias de administração incluem administração oral.

Anticorpos e moléculas biespecíficas da invenção também podem ser co-administradas com adjuvantes e outros agentes terapêuticos. Será apreciado que o termo “coadministrado” como usado aqui inclui qualquer e todas de administração simultânea, separada, ou sequencial dos anticorpos e conjugados da presente invenção com adjuvantes e outros agentes, incluindo administração como parte de um regime de dosagem. Os anticorpos normalmente são formulados em um carreador, sozinho ou em combinação com ditos agentes. Exemplos de ditos carreadores incluem soluções, solventes, meio de dispersão, agentes de retardamento, emulsões e semelhantes. A utilização de ditos meios para substâncias farmacologicamente ativas é conhecida na técnica. Qualquer outro carreador convencional apropriado para o uso com as moléculas está dentro do escopo da invenção atual.

Agentes apropriados para coadministração com os anticorpos

conjugados, biespecíficos e composições incluem outros anticorpos, citotoxinas e/ou drogas, como adjuvantes, agentes imunoestimulantes e/ou imunossupressores. Em uma modalidade, o agente é um agente quimioterápico. Os anticorpos, biespecíficos e composições podem ser

5 administrados em combinação com radiação.

Agentes quimioterápicos adequados para coadministração com os anticorpos e conjugados da presente invenção no tratamento de tumores incluem, por exemplo: taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina,

10 colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-hidroxi antracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e seus análogos ou homólogos dos mesmos. Outros agentes incluem, por exemplo, anti-metabólitos (por exemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-

15 tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por exemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclina (por exemplo, daunorubicina (antigamento

20 daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (por exemplo, dactinomicina (antigamento actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitótico (por exemplo, vincristina e vinblastina) e temozolomida.

Agentes que eliminam ou inibem atividades

25 imunossupressoras, por exemplo, por células imunes (por exemplo, as células T reguladoras, células NKT, macrófagos, células supressoras derivadas de mieloides, células dendríticas imaturas ou supressoras) ou fatores supressores produzidos pelo tumor ou células hospedeiras no microambiente local do tumor (por exemplo, TFGbeta, indoleamina 2,3 dioxigenase-IDO), também

podem ser administrados com anticorpos e conjugados da presente invenção. Ditos agentes incluem anticorpos e drogas de moléculas pequenas como inibidores IDO como 1 metil triptofano ou derivados.

Agentes apropriados para coadministração com os anticorpos e
 5 biespecíficos da presente invenção para o tratamento de ditos distúrbios imunes incluem, por exemplo, agentes imunossupressores como a rapamicina, ciclosporina, e FK506; agentes anti-TNF α como etanercept, adalimumab e infliximab; e esteroides. Exemplos de esteroides naturais e sintéticos específicos incluem, por exemplo: aldosterona, beclometasona, betametasona,
 10 budesonida, cloprednol, cortisona, cortivazol, deoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, difluorocortolona, fluclorolona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, fluocinonida, butil fluocortin, fluorocortisona, fluorocortolona, fluorometolona, flurandrenolona, fluticasona, halcinonida, hidrocortisona, icometasona, meprednisona, metilprednisolona, parametasone,
 15 prednisolona, prednisona, tixocortol e triancinolona.

Agentes apropriados para coadministração com os anticorpos e biespecíficos da presente invenção para indução ou melhora de uma resposta imune incluem, por exemplo, adjuvantes e/ou agentes imunoestimulantes, não limitando os exemplos que foram revelados aqui anteriormente. Um agente
 20 imunoestimulante preferencial é um agonista de TLR3, como Poly IC:

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitantes. O conteúdo da listagem de Sequência, figuras e todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido é expressamente
 25 incorporado aqui por referência.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Geração de anticorpos monoclonais humanos específicos para CD27

Os anticorpos monoclonais anti-CD27 humanos foram gerados

por imunização de cepa HC2/KCo7 de camundongos transgênicos HuMAb® (“HuMAb” é uma marca registrada de Medarex, Inc., Princeton, New Jersey) com um antígeno solúvel CD27 humano. Camundongos HC2/KCo7 HuMAb foram gerados conforme descrito nas patentes US 5.770.429 e 5.545.806, as
5 revelações completas são incorporadas aqui por referência.

Antígeno e imunização: O antígeno foi uma proteína de fusão solúvel compreendendo um domínio extracelular CD27 fundido com um domínio Fc do anticorpo (proteínas quiméricas Fc-CD27 recombinante humano (R&D Systems). O antígeno foi misturado com adjuvante de Freund
10 completo (Sigma) para a primeira imunização. Depois disso, o antígeno foi misturado com Freund incompleto (Sigma). Camundongos adicionais foram imunizados com a proteína solúvel CD27 em sistema adjuvante RIBI MPL plus TDM (Sigma). 5-25 microgramas de antígeno CD27 recombinante solúvel em PBS ou 5×10^6 células CHO transfectadas para expressão de
15 superfície de CD27 humano em PBS foram misturados 1:1 com o adjuvante. Os camundongos foram injetados com 100 microlitros do antígeno preparado na cavidade peritoneal a cada 14 dias. Os animais que desenvolveram títulos anti-CD27 receberam uma injeção iv de 10 microgramas de antígeno CD27 recombinante solúvel três a quatro dias antes da fusão. Os baços dos
20 camundongos foram colhidos e os esplenócitos isolados usados para preparação de hibridoma.

Preparação de hibridoma: A linhagem de célula de mieloma murino P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) foi usada para as fusões. RPMI 1640 (Invitrogen) contendo 10% FBS foi usado para cultura de células de
25 mieloma múltiplo. Suplementos de meio adicionais foram adicionados ao meio de crescimento de hibridoma, que incluía: Meio 3% Origen-Fator de clonagem de hibridoma (Igen), 10% FBS (Sigma), L-glutamina (Gibco) 0,1% gentamicina (Gibco), 2-mercaptoetanol (Gibco), HAT (Sigma; 1.0×10^{-4} M hipoxantina, $4,0 \times 10^{-7}$ M aminopterina, $1,6 \times 10^{-5}$ M timidina), ou HT

(Sigma; 0×10^{-4} M hipoxantina, $1,6 \times 10^{-5}$ M timidina).

Células do baço foram misturadas com as células de mieloma P3x63Ag8.653 em uma proporção 6:1 e peletizadas por centrifugação. Polietileno glicol foi adicionado gota a gota com mistura cuidadosa para facilitar a fusão. Hibridomas foram deixados crescer por uma a duas semanas até que se estabelecessem colônias visíveis. O sobrenadante foi coletado e usado para triagem inicial para IgG humana através de ELISA usando uma captura específica de cadeia capa humana e uma detecção específica do Fc humana. Sobrenadantes positivos para IgG foram então avaliados para especificidade CD27 através de citometria de fluxo ou ELISA para detecção de anti-CD27.

Hibridomas produzindo anticorpos monoclonal humanos específicos (mAbs humana; IgG) foram subclonados e expandidos. Os mAbs humanos produzidos foram então purificados por cromatografia de coluna de proteína A em condições padrões que levaram ao isolamento de um número de anticorpos de interesse particular, que foram projetados como 4B7-1B3 (também chamado aqui como 4B7), 3H12-1C8 (também chamado aqui como 3H12), 1F5-1H5 (também chamado aqui como 1F5), 2C2-1A10 (também chamado aqui como 2C2), 2G9-1D11 (também chamado aqui como 2G9), 1H8-B4 (também chamado aqui como 1H8), 3H12-1E12 (também chamado aqui como 3H12), 3G1-1A11 (também chamado aqui como 3G1) (1B10), 4A2-B11 (também chamado aqui como 4A2), 3A10-G10 (também chamado aqui como 3A10), 2G11-B5 (também chamado aqui como 2G11), 4H11-G11 (também chamado aqui como 4H11), 2H3-E8 (também chamado aqui como 2H3), 4A7-B3 (também chamado aqui como 4A7), 3H8-1B11 (também chamado aqui como 3H8) e 1G5-1B9 (também chamado aqui como 1G5).

Os hibridomas também foram analisados para reatividade cruzada com o CD27 de macaco rhesus e todos foram positivos para ligação.

Exemplo 2

Determinação de afinidade e taxas constantes de mAbs humanos por ressonância de plasmon de superfície (SPR)

A cinética de ligação e afinidade de vários anticorpos anti-CD27 humanos do Exemplo 1 foram examinados por análise de ressonância de plasmon de superfície (SPR) BiacoreTM utilizando um instrumento BiacoreTM 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suécia) de acordo com as orientações do fabricante.

Proteína CD27 recombinante humano purificado/TNFRSF7/Fc químera (R&D Systems no. de catálogo 382-CD) foi covalentemente ligada a um chip de sensor BiacoreTM CM5 (carboximetilado dextrano covalentemente ligado a uma superfície de ouro; N.º de produto Biacore BR-1000-14) usando química padrão de acoplamento de amina com um Kit de acoplamento de amina fornecida pelo Biacore de acordo com as orientações do fabricante (BIAcore Produto N.º BR-1000-50, compreendendo reagentes de acoplamento N-hidroxisuccinimida (NHS) e 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida cloridrato (EDC)). Níveis baixos de ligante foram imobilizados para limitar os efeitos de transporte de massa do analito nos parâmetros cinéticos, como R_{MAX} observado foi na ordem de 100-400 RU.

A ligação foi medida fluindo os anticorpos sobre o chip sensor de tampão HBS-EP (tampão HBS-EP, Biacore N.º de produto BR-1001-88: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (HEPES) 0,01M, cloreto de sódio 0,15M ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) 3mM, Surfactante P20 0,005%), em concentrações variando de 1,56 a 50 nM e com uma vazão de 30 µl/minuto por 180 segundos. As cinéticas de dissociação e associação de antígeno-anticorpo foram seguidas por 480 segundos ou 1200 segundos para anticorpos com taxas mais lentas de dissociação.

Os controles correspondentes foram realizados em cada caso, utilizando um fluxo de célula em branco com nenhuma proteína imobilizada para subtração do “background”. Injeções sequenciais de HCl 10mM durante

10 segundos a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ seguido de 10mM de glicina pH 2,0 por 30 segundos a 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ foram usadas como as condições de regeneração ao longo do estudo.

Software Biacore's BIAevaluation versão 3,2 (Biacore AB, Uppsala, Suécia) foi usado em cada caso para derivar parâmetros cinéticos a partir da série de concentração de analito diluído em tampão de corrida HBS-EP. As curvas de associação e dissociação foram equipadas para um modelo de ligação Langmuir 1:1 usando software Biacore™ BIAevaluation (Biacore AB) de acordo com as instruções do fabricante.

Os parâmetros de afinidade e cinéticos (com background subtraído) como determinado são mostrados na Figura 1.

Para cada anticorpo, os valores apresentados são a média de duas séries distintas de experimentos, utilizando células de fluxo preparadas separadamente em cada caso, (onde k_a = constante de taxa de associação, k_d = constante de taxa de dissociação, K_D = constante de equilíbrio de dissociação (medida de afinidade), K_A = constante de equilíbrio da associação, R_{max} = sinal de resposta máxima SPR).

Exemplo 3

Ensaio ELISA para determinar características de ligação a mAb humano em CD27

Placas de microtitulação foram revestidas com CD27 solúvel ou humana recombinante ou de macaco em PBS, e então bloqueadas com albumina sérica bovina em PBS. mAbs humanos purificados em proteína A e um isotipo controle foram adicionados em concentrações de saturação e incubadas a 37°C. As placas foram lavadas com PBS/Tween e depois incubadas com um reagente policlonal anti-IgG humano de cabra específico para Fc conjugado com fosfatase alcalina a 37°C. Após a lavagem, as placas foram desenvolvidas com substrato pNPP (1 mg/ml) e analisadas no OD 405-650 usando um leitor de placas de microtitulação. Curvas de ligação

representativas são mostradas na Figura 2. Os resultados também foram utilizados para estimar a concentração de saturação a 50% (valor de C em curva de ajuste de 4 parâmetros) conforme mostrado na tabela 1 abaixo.

Para estabelecer que macacos cynomolgus são um modelo relevante para o teste de mAbs anti-CD27, várias concentrações de CD27 de macaco purificado ou CD27 humano foram capturados para placas ELISA com anticorpo anti-Flag, seguido de incubação com mAb humano anti-CD27. Um anticorpo Fc-HRP anti-IgG humano de cabra e substrato Super azul TMB foram usados para a detecção. Os resultados são mostrados na tabela 1, que indicam semelhante ligação a CD27 de macaco e humano. As curvas de ligação representativas para anticorpo 1F5 também são mostradas na Figura 3.

Tabela 1.

Caracterização de mAb anti-CD27 selecionado

mAb	Meia ligação máxima a CD27 humano (M)**	Meia ligação máxima a CD27 humano (µg/ml)**	Meia ligação máxima a CD27 de macaco (µg/ml)**	
1G5	4,9E-10	0,074	0,065	
1H8	4,3E-10	0,064	0,105	
3H12	5,7E-10	0,085	0,123	
3H8	4,6E-10	0,069	0,065	
2G9	4,3E-10	0,064	0,069	
1F5	3,9E-10	0,059	0,12	
3A10	6,3E-10	0,094	Sem ligação	
2C2	3,0E-10	0,045	0,034	

** estimado por ligação a placas revestidas com CD27 em um formato de ELISA

Em outro experimento, para estabelecer a distribuição semelhante de ligação 1F5 a células do sangue periféricas, PBMCs foram isolada a partir de sangue de 3 humanos e 3 macacos cynomolgus. As células foram coradas com 1F5 mAb juntamente com marcadores para delinear as principais populações de células T e células B que expressam CD27. A seguinte tabela (tabela 2) resume o média $\pm$ erro padrão de resultados para o células humanas e de macaco em relação a porcentagem de células expressando CD27 e a intensidade da expressão (IFM). Estes dados estabelecem uma distribuição semelhante de ligação 1F5 a células do sangue

periféricas de humanos e macacos.

Tabela 2

Análise	Células T CD4+		Células T CD8+		Células B (CD20+)		Células NK	
	humano	macaco	humano	macaco	humano	macaco	humano	macaco
%CD27 ⁺ ^b	84±5	81±1	70±12	90±1	37±4	15±1	11±4	88±6
MFI ^c	1517±123	461±14	1415±153	519±11	893±101	491±113	667±28	1050±42

Exemplo 4

4A: Bloqueio de ligação sCD70 por ELISA

5 O efeito dos mAbs humanas do exemplo 1 na ligação de CD70 solúvel (sCD70) à proteína CD27 foi medido por ELISA. Uma placa de microtitulação foi revestida com 1µg/ml de CD27 humano recombinante solúvel/Fc quimera de R&D Systems a 1µg/mL., então bloqueado com 5% PBA. Os anticorpos anti-CD27 ([final] = 25µg/mL) foram pré-misturados com CD70-biotina solúvel humana recombinante de US Biologicals ([final] = 10 0,5µg/mL) e adicionados à placa. rCD70 capturado por CD27 foi detectado com estreptavidina-HRP e substrato Super Azul TMB. Os resultados (mostrados como % de bloqueio) são mostrados na Figura 4 com controles conforme indicado. Estes resultados mostram que vários dos anticorpos 15 (incluindo 1F5, 1H8, 3H12 e 1A4) tiveram a propriedade de bloqueio ou pelo menos significativamente inibindo a ligação de sCD70.

4B: CD27 mAb se liga a CD27 em linhagens de células linfoblastoides humanas e bloqueia a ligação de ligante (CD70)

20 A ligação de mAb 1F5 anti-CD27 humano a linhagens de células linfoblastoides humanas e bloqueio de ligação sCD70, foi analisada por citometria de fluxo, usando um citômetro de fluxo Becton Dickinson FACSCanto II. Os resultados são mostrados na Figura 5 e mostram que 1F5 efetivamente se liga a uma variedade de linhagens de células e inibe competitivamente a ligação do sCD70.

Exemplo 5

Ligação de mAbs humanas a células que expressam CD27 humano

A capacidade de mAbs humana anti-CD27 em ligar a CD27

em células expressando CD27 humano na sua superfície foi investigada por citometria de fluxo, como segue.

Anticorpos foram testados para a ligação com linhagens de células humanas expressando D27 humana na sua superfície. mAbs 2C2, 3H8 e 1F5 humanos purificados em proteína A foram incubados com células Jurkat, Raji, Ramos e Daudi expressando CD27 humano, bem como células de controle a 4°C. Todos os anticorpos foram usados em concentrações de saturação. Após 1 hora, as células foram lavadas com PBS contendo 0,1% de BSA e 0,05% NaN₃ (PBA) e os anticorpos ligados foram detectados por incubação das células com uma sonda Fc-específica anti-IgG humano de cabra marcada com PE, a 4° C. O excesso de sonda foi lavado das células com PBA e a fluorescência da célula associada foi determinada pela análise usando um instrumento LSRTM (BD Biosciences, NJ, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Como mostrado nas figuras 6 e 7, os mAbs humano demonstraram alta nível ligação às células expressando CD27 humano. Estes dados demonstram que estes anticorpos ligam-se eficientemente e especificamente a CD27 humano expresso em células vivas, em comparação às células de controle.

Exemplo 6

Bloqueio cruzado/competição de mAbs humanos determinado por ELISA

Uma placa de microtitulação foi revestida com uma proteína de fusão quimérica humana-Fc CD27 recombinante, então bloqueada com 5% BSA em PBS. mAbs humanas não conjugadas (20^μg/mL) foram misturadas com anticorpos secundários marcados com peroxidase de rábano (0,5 ^μg/mL), então adicionados à placa e incubados a 37°C. As placas foram lavadas com PBS/Tween e desenvolvidas com substrato TMB e analisadas em OD 450 usando um leitor de placas de microtitulação. Os resultados,

mostrados nas figuras 8 a 10, indicam que um primeiro conjunto de mAbs humano (incluindo os mAbs 1F5, 1H8 e 3H12) competiram de modo cruzado entre si (Ver Figura 8), que um conjunto adicional de mAbs humanos (incluindo os mAbs 2C2, 3H8 e 1G5 e 2G9) também competiram cruzado uns com os outros (Ver Figura 9), e que mAb humano 3A10 se liga a um único epítopo mas pode se ligar em um local distinto, mas possivelmente perto dos locais de ligação de mAbs 1F5, 1H8 e 3H12, uma vez que estes anticorpos foram capazes de parcialmente bloquear de modo cruzado a ligação de 3A10 a CD27 (Ver Figura 10).

10 **Exemplo 7**

Citotoxicidade celular dependente de complemento (CDCC ou CDC)

As células alvo (células de Linfoma Raji) foram cultivadas (em meio AIM-V) por 1-2 horas a 37°C, 5%CO₂ na presença de anticorpos anti-CD27 e complemento de coelho (diluição final de 1: 15) em um volume final de 150ul. Controles apropriados com um sinal de vazamento (apenas para alvos) e sinal MAX (alvos com detergente LysolTM em 12% para uma concentração final de 4%) foram incluídos também. As células foram ajustadas a 1 x 10⁶/ml e 50ul foram adicionados a cada poço (para gerar 50.000 células/poço). Os poços foram então ressuspensos e 100ul de suspensão celular foi transferida para uma placa opaca, branca. Para cada um destes poços, 100uL de reagente Promega CellTiter Glo foi adicionado e a placa foi misturada por 2 minutos em temperatura ambiente. A placa foi deixada para incubar durante 10 minutos para estabilizar o sinal luminescente. A luminescência foi registrada em um leitor de placa Perkin Elmer Victor X4.

25 A citotoxicidade foi determinada com a seguinte fórmula: $(100 - ((\text{amostra} - \text{MAX}) / (\text{vazamento} - \text{MAX}))) \times 100$. Os resultados (mostrados como % de lise) são mostrados na Figura 11, que pode ser visto que um número de anticorpos anti-CD27 apresentou atividade CDCC significativa.

Em outro experimento, células alvo (Ramos) foram lavadas e

carregadas com calceína AM (Molecular Probes). As células carregadas foram então lavadas novamente e ressuspensas em $1 \times 10^6/\text{ml}$, em meios de cultura (RPMI + 10% FBS). As células alvo foram cultivadas por 2 horas a 37°C , 5% CO_2 na presença de anticorpos anti-CD27 e complemento de coelho (diluição final de 1:15) em um volume final de 150ul. Controles apropriados com um sinal de vazamento (apenas para alvos) e sinal MAX (alvos com tritom X-100 a 20% para uma concentração final de 2%) foram incluídos também. Após a incubação, 75ul de sobrenadante dos poços foram transferidos para uma placa opaca, preta. A fluorescência (Ex-485; Em 535) foi registrada em um leitor de placa Perkin Elmer Victor X4. A citotoxicidade específica foi determinada com a seguinte fórmula: $(\text{experimental} - \text{lise espontânea}) / (\text{máximo de lise} - \text{lise espontânea}) \times 100$. Os resultados, mostrados na Figura 12, indicam que mAb anti-CD27 (1F5) mostrou pelo menos 10% de atividade de CDC nas células de Ramos em uma concentração de anticorpo de $3\mu\text{g}/\text{ml}$.

Exemplo 8

Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC)

Células alvos (células de Linfoma Raji) foram lavadas e carregadas com reagente BATDA (Perkin Elmer). As células carregadas foram então lavadas novamente e ressuspensas em $2 \times 10^5/\text{ml}$, em meios de cultura (RPMI + 10% FBS). As células efetoras foram preparadas e ajustadas às concentrações apropriadas em meios de cultura para gerar proporções desejadas de efetor: alvo (100:1 – 50:1). Em uma placa de fundo redondo, células-alvo, células efetoras e anticorpo foram adicionados em um volume final de 150ul. Foram utilizados controles apropriados, incluindo um sinal de vazamento (apenas para alvos), um sinal de lise espontânea (alvos + efetores) e um sinal máximo de lise (alvos + detergente LysolTM em 12% para uma concentração final de 4%). As células foram peletizadas na placa e incubadas durante 2 horas a 37°C , 5% CO_2 . Após a incubação, 20ul de sobrenadante dos

poços foram transferidos para uma placa opaca, preta. Para cada um destes poços, 200ul da solução európio (Perkin Elmer) foi adicionada e a placa foi misturada por 15 minutos. A fluorescência resolvida em tempo foi registrada em um leitor de placa Perkin Elmer Victor X4. A citotoxicidade específica foi determinada com a seguinte fórmula: (experimental – lise espontânea)/(máximo de lise – lise espontânea) x 100. Os resultados (mostrados como % de lise) são mostrados na Figura 13, que pode ser visto que um número de anticorpos anti-CD27 apresentou atividade ADCC significativa.

Em outro experimento, células alvo (células de Linfoma Ramos e Daudi) foram lavadas e carregadas com calceína AM (Molecular Probes). As células carregadas foram então lavadas novamente e ressuspensas em 1×10^5 /ml em meios de cultura (RPMI + 10% FBS). As células efetoras foram preparadas e ajustadas às concentrações apropriadas em meios de cultura para gerar proporções desejadas de efetor:alvo (75:1). Em uma placa de fundo redondo, células-alvo, células efetoras e anticorpo foram adicionados em um volume final de 150ul. Foram utilizados controles apropriados, incluindo um sinal de vazamento (apenas para alvos), um sinal de lise espontânea (alvos + efetores) e um sinal máximo de lise (alvos + Triton X-100 em 20% para uma concentração final de 2%). As células foram peletizadas na placa e incubadas durante 4 horas a 37°C, 5%CO₂. Após a incubação, 75ul de sobrenadante dos poços foram transferidos para uma placa opaca, preta. A fluorescência (Ex-485; Em 535) foi registrada em um leitor de placa Perkin Elmer Victor X4. A citotoxicidade específica foi determinada com a seguinte fórmula: (experimental – lise espontânea)/(máximo de lise – lise espontânea) x 100. Os resultados, mostrados na Figura 14, indicam que mAb anti-CD27 (1F5) mostrou pelo menos 10% de atividade de ADCC (medida como citotoxicidade específica) nas células Daudi e Ramos em uma concentração de anticorpo de 3µg/ml e proporção de células efetoras:

alvo de 75:1.

Exemplo 9

Sequenciamento de Anticorpo

Conforme descrito acima no Exemplo 1, mAbs humanos de
 5 hibridomas produzindo mAbs humanos específicos IgG foram purificados por
 cromatografia de coluna com proteína A, que levou ao isolamento de um
 painel de anticorpos (mAbs humano) de particular interesse. As regiões
 codificantes V_H e V_L de mAbs humanos 4B7, 3H12, 1F5, 2C2, 2G9, 1H8,
 3H12, 3G1 (1B10) 4A2, 3A10, 2G11, 4H11, 2H3, 4A7, 3H8 e 1G5 foram
 10 identificadas usando RNA dos correspondentes hibridomas. O RNA foi
 transcrito reverso a cDNA, as regiões codificantes V foram amplificadas por
 PCR e o produto de PCR foi sequenciado. As seguintes são sequências
 nucleicas e de aminoácidos das regiões V_H e V_L de mAbs humanos (no caso
 de sequências de aminoácidos, as regiões determinantes de
 15 complementariedade (CDRs) são sublinhadas).

3H8 VH (VH 3-7; D7-27; JH2)

Sequência de ácido nucleico V_H (SEQ ID NO: 5)

atggagttggggctgagctgggttttcctgttgctattttagaaggtgtccagtgtaggtgcagctggtggagt
 ctgggggaggttgggtccagcctggggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcacctttagtagtt
 attggatggcctgggtccgccaggctccagggaagggtggagtggtgggcaatataaagcaagatgga
 agtgagaaatactatgtggactctgtgaagggccgattcaccatctccagagacaacgccaaagaactcactgta
 tctacaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaggggaactggggatggactgg
 tacttcgatctctggggccgtggcacctggtcactgtctctca

Sequência de aminoácido V_H (SEQ ID NO: 6) (incluindo
 peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
SYWMAWVRQAPGKGLEWLGNIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRELGMDFDLWGRGTLVTVSS

20 Sequência de aminoácido “maduro” V_H (SEQ ID NO: 7)

excluindo peptídeo sinal:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMAWVRQAPGKGLE
WLGNIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA
VYYCVRELGMDWYFDLWGRGTLVTVSS

V_H CDR1 (SEQ ID NO: 8): GFTFSSYW

V_H CDR2 (SEQ ID NO: 9): IKQDGSEK

V_H CDR3 (SEQ ID NO: 10): VRELGMDWYFDL

3H8 VK #2 (VK 3-11; JK1)

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 11)

Atggaagccccagctcagcttctctctctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgttgaca
cagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgtga
cagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcaccaacagg
gccactggcatcccagccaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcaacctag
agcctgaagattttgcagtttattactgtcagcagcgtagcaactggcctccgacgttcggccaagggaccaag
gtggaaatcaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 12) (incluindo

5 peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVD
SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLE
PEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 13) excluindo
peptídeo sinal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPGQAPRLLI
YDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPT
TFGQGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 14): QSVDSY

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 15): DAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 16): QQRSNWPPT

3H8 VK #3 (VK 3-11; JK1)

Outra cadeia leve também demonstrou ser ativa como segue (embora apenas a cadeia leve acima (3H8-1B11 VK #2) foi usada nos exemplos acima):

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 17)

Atggaagccccagctcagcttctcttctctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgttgaca
cagctctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttag
cagctacttagcctggtaccaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcattccagcagg
gccactggcatcccagacaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagactgg
agcctgaagattttgcagtgtattactgtcagcagcgtagcaactggcctccgacgttcggccaagggaaccaag
gtggaaatcaaa

5 Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 18) (incluindo peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS
SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
PEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 19) excluindo peptídeo sinal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
DASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF
GQGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 20): QSVSSY

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 21): DAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 22): QQRSNWPPT

2C2 VH (VH 3-33; D1-7; JH4)

10 Sequência de ácido nucleico V_H (SEQ ID NO: 23)

Atggagtttgggctgagctgggttttctcgtgtctctttaagaggtgtccagtgtcaggtgcaactggtggagt
ctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgcgactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtag
ctatgacatacactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggaatgatgg
aagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccacgaactcgctgtt

tctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattattgtgtgggaggaactgctgaccttgaac
actgggaccaggaaccctggtcaccgtctcctca

Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 24) (incluindo peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF
SSYDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
STNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVGGTADLEHWDQGTLTVSS

Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 25) excluindo peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEW
VAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVY
YCVGGTADLEHWDQGTLTVSS

V_HCDR1 (SEQ ID NO: 26): GFTFSSYD

V_HCDR2 (SEQ ID NO: 27): IWNDGSNK

V_HCDR3 (SEQ ID NO: 28): VGGTADLEHWDQ

5 **2C2 VK (VK 1D-16; JK4)**

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 29)

Atgagggtcctcgctcagctcctggggctcctgctgctctgttcccagggtgccagatgtgacatccagatgac
ccagctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagggtattag
cagctggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgc
aaagtggggtcccatcaagggtcagcggcagtgatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctctcactttcggcggagggaaccaaggtg
gagatcaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 30) (incluindo peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQG
ISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 31) excluindo

peptídeo sinal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI
YAAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLT
FGGGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 32): QGISSW

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 33): AAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 34): QQYNSYPLT

1F5 VH (VH 3-33; D7-27; JH4)

Sequência de ácido nucleico V_H(SEQ ID NO: 35)

Atggagtttgggctgagctgggttttctcgtgtctctttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggaggag
ctgggggagggcgtgtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagt
tatgacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaa
gtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
ctccaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggtagtggtaactgggggtt
tctttgactactggggccagggaaccctgggtcacctgtctctca

Sequência de aminoácido VH(SEQ ID NO: 36) (incluindo

5 peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF
SSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGTLVTVSS

Sequência de aminoácido VH(SEQ ID NO: 37) excluindo

peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLE
WVAVIWDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARGSGNWGFFDYWGQGTLVTVSS

V_H CDR1 (SEQ ID NO: 38): GFTFSSYD

V_H CDR2 (SEQ ID NO: 39): IWDGSNK

V_H CDR3 (SEQ ID NO: 40): ARGSGNWGFFDY

1F5 VK #2 (VK 1D-16; JK1)

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 41)

Atgagggctctcgctcagctcctggggctcctgctgctctgtttccaggtgccagatgtgacatccagatgac
ccagtctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcactgtcgggcgagtcagggtattag
caggtggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgc
aaagtgggggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatacttaccctcggacgttcggccaagggaaccaaggt
ggaaatcaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 42) (incluindo
peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGIS
RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK

5 Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 43) excluindo
peptídeo sinal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLI
YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNTYPRT
FGQGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 44): QGISRW

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 45): AAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 46): QQYNTYPRT

1H8 VH (VH 3-33; D7-27; JH4)

Sequência de ácido nucleico V_H (SEQ ID NO: 47)

Atggagtttgggctgagctgggttttcctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctggtggagt
ctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcacctcaatatac
tatgacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaa
gtaatcaatactatgcagactccgtgaagggccgattcacatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
ctgcaaatgaacattttgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggtactcactgggggtacttt
gactactggggccagggaaccctggtcaccgtctctca

Sequência de aminoácido V_H (SEQ ID NO: 48) (incluindo

peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF
NIYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDN
 SKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCARGTHWGYFDYWGQGTLVTVSS

Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 49) excluindo
 peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNIYDMHWVRQAPGKGLE
 WVAVIWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNILRAEDTA
 VYYCARGTHWGYFDYWGQGTLVTVSS

V_HCDR1 (SEQ ID NO: 50): GFTFNIYD

V_HCDR2 (SEQ ID NO: 51): IWYDGSNQ

V_HCDR3 (SEQ ID NO: 52): ARGTHWGYFDY

1H8 VK (VK 1D-16; JK1)

5

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 53)

Atgagggctctcgctcagctcctggggctcctgctgctctgtttccaggtgccagatgtgacatccagatgac
 ccagctctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagggtattag
 cagctggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccaatttgca
 aagtgggggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcag
 cctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctcggacgttcggccaagggaaccaagggtg
 gaaatcaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 54) (incluindo
 peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS
SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
 QPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 55) excluindo
 peptídeo sinal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSLAWYQQKPEKAPKSLI
 YAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPRT

FGQGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 56): QGISSW

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 57): AAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 58): QQYNSYPRT

1G5 VH (VH 3-33; D6-19; JH2)

Sequência de ácido nucleico V_H(SEQ ID NO: 59)

Atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggt
gcaactggtggagtctgggggagggcgtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctgg
5 attcagcttcagtagctatggcatgcactgggtccgccagggtccaggcaagggactggagtgggtggcactt
ctatggtatgatggtagccataaagactttgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattcc
aagaacacgctagatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagag
ggttttagcagtacctggctactggtacttcgatctctggggccgtggcaccctggctactgtctcctca

Sequência de aminoácido VH(SEQ ID NO: 60) (incluindo
10 peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSF
SSYGMHWVRQAPGKGLEWVALLWYDGSHKDFADSVKGRFTISRDN
SKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLAVPGHWYFDLWGRGTLVT
VSS

Sequência de aminoácido VH(SEQ ID NO: 61) excluindo
peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLE
WVALLWYDGSHKDFADSVKGRFTISRDN SKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLAVPGHWYFDLWGRGTLVTVSS

V_H CDR1 (SEQ ID NO: 62): GFSFSSYG

V_H CDR2 (SEQ ID NO: 63): LWYDGSHK

V_H CDR3 (SEQ ID NO: 64): AREGLAVPGHWYFDL

1G5 VK (VK 1-13; JK1)

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 65)

Atgagggtccccgctcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgcatccagttgac

ccagtctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcacttgccgggcaagtcagggcatta
gcagtgctttagcctggatcagcagaaaccagggaagctcctaagctcctgatctatgatgcctccagtttg
aaagtggggtcccatcaagggtcagcggcagtgatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagtttaatacttaccctcggacgttcggccaagggaaccaagg
gaaatcaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 66) (incluindo peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS
SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQFNTYPRTFGQGTKVEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 67) excluindo peptídeo sinal:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIY
DASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNTYPRTF
GQGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 68): QGISSA

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 69): DAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 70): QQFNTYPRT

5 **2G9 VH (VH 3-33; D1-7; JH4)**

Sequência de ácido nucleico V_H(SEQ ID NO: 71)

Atggagtttgggctgagctgggttttctcgtgctctttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagttggtggagt
ctgggggaggcgtgtccagcctgggaggtccctgcgactctcctgtgcagcgtctggattcacctcagtag
ccatgacatacactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggaatgatgg
aagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccacgaactcgctgtt
tctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattattgtgtgagaggaactgctgacctgaac
actgggaccagggaaccctggtcaccgtctcctca

Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 72) (incluindo peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTL

SSHDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVRGTADLEHWDQGTLVTVSS

Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 73) excluindo peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSHDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVRGTADLEHWDQGTLVTVSS

V_HCDR1 (SEQ ID NO: 74): GFTLSSHDI

V_HCDR2 (SEQ ID NO: 75): IWNDGSNK

V_HCDR3 (SEQ ID NO: 76): VRGTADLEHWDQ

2G9 VK (VK 1D-16; JK4)

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 77)

Atgagggctctcgctcagctcctggggctctgctgctctgttcccaggtgccagatgtgacatccagatgac
ccagctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagggtattag
cagctggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgc
aaagtggggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctctcactttcggcggaggggaccaaggtg
gagatcaaa

5 Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 78) (incluindo peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS
SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 79) excluindo peptídeo sinal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLI
YAAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPLT
FGGGTKVEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 80): QGISSW

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 81): AAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 82): QQYNSYPLT

3A10 VH (VH 3-33; D3-10; JH3)

Sequência de ácido nucleico V_H(SEQ ID NO: 83)

Atggagtttgggctgagctgggttttctcgtgctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggaggag
ctgggggagggcgtgtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtc
tatggcatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggccggagtggtggcaattatatggtatgatga
agtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgga
tctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagatggatggactactatg
gttcggggacttaatgttttgatatctggggccaagggacaatggtcaccgtctcttca

Sequência de aminoácido VH(SEQ ID NO: 84) (incluindo
peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTF
SHYGMHWVRQAPGKGPEWVAIIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCARDGWTTMVRGLNVFDIWGQGT
MTVSS

5 Sequência de aminoácido VH(SEQ ID NO: 85) excluindo
peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGPE
WVAIIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCARDGWTTMVRGLNVFDIWGQGT
MTVSS

V_H CDR1 (SEQ ID NO: 86): GFTFSHYG

V_H CDR2 (SEQ ID NO: 87): IWYDGSNK

V_H CDR3 (SEQ ID NO: 88): ARDGWTTMVRGLNVFDI

3A10 VK #1 (VK 1D-16; JK5)

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 89)

Atgagggtcctcgtcagctcctggggctcctgctgctctgtttccaggtgccagatgtgacatccagatgac
ccagctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcaggatattag
cagctggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgc

aaagtggggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctcccaccttcggccaagggacacgactg
gagattaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 90) (incluindo peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDIS
SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTRLEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 91) excluindo peptídeo sinal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLI
YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPT
FGQGTRLEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 92): QDISSW

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 93): AAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 94): QQYNSYPPT

5 **3A10 VK #4 (VK 1-13; JK5)**

Outra cadeia leve também demonstrou ser ativa como segue (embora apenas a cadeia leve acima (3H8-1B11 VK #1) foi usada nos exemplos acima):

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 95)

Atgagggctctcgctcagctcctggggcttctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgccatccagttgac
ccagctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagggcatta
gcagtgctttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgc
aaagtggggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatagttaccctcccaccttcggccaagggacacgactg
gagattaaa

10 Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 96) (incluindo peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MRVLAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS
SALAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ
PEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGTRLEIK

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 97) excluindo peptídeo sinal:

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSASALAWYQQKPEKAPKSLIY
AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTF
 GQGTRLEIK

V_L CDR1 (SEQ ID NO: 98): QGISSA

V_L CDR2 (SEQ ID NO: 99): AAS

V_L CDR3 (SEQ ID NO: 100): QQYNSYPPT

3H12 VH (VH 3-33; D7-27; JH4)

Sequência de ácido nucleico V_H(SEQ ID NO: 101)

atggagtttgggctgagctgggttttctcgttgctcttttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctgggtggagt
 ctgggggagggcgtgtgtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtgcaacgtctggattcaccttcagtag
 ctatgacatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatttggtatgatgga
 agtaataaataactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgta
 tctccaaatgaacagcctgggagacgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggtagtggttaactgggggt
 ttctttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca

5 Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 102) (incluindo peptídeo sinal em itálico sublinhado):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTF
SSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLGDEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWGQGTLVTVSS

Sequência de aminoácido V_H(SEQ ID NO: 103) excluindo peptídeo sinal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLE
WVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLGDEDTA
VYYCARGSGNWGFFDYWGQGTLVTVSS

V_HCDR1 (SEQ ID NO: 104): GFTFSSYD

V_HCDR2 (SEQ ID NO: 105): IWYDGSNK

V_HCDR3 (SEQ ID NO: 106): ARGSGN WGFFDY

3H12 VK #2 (VK 1D-16; JK1)

Sequência de ácido nucleico V_L (SEQ ID NO: 107)

Atgagggctctcgctcagctcctggggctcctgctgctctgtttcccagggtgccagatgtgacatccagatgac
ccagctccatcctcactgtctgcatctgtaggagacagagtcacatcactgtcgggcgagtcagggtattag
cagggtggttagcctggtatcagcagaaaccagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagttgc
aaagtggggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggacagatttcacttcacatcagcagcctgca
gcctgaagattttgcaacttattactgccaacagtataatacttaccctcggacgttcggccaagggaaccaaggt
ggaaatcaaa

Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 108) (incluindo
peptídeo sinal em *itálico sublinhado*):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS
RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK

5 Sequência de aminoácido V_L (SEQ ID NO: 109) excluindo
peptídeo sinal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLI
YAASSLQSGVPSRFSSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNTYPRT
FGQGTKVEIK

V_LCDR1 (SEQ ID NO: 110): QGISRW

V_LCDR2 (SEQ ID NO: 111): AAS

V_LCDR3 (SEQ ID NO: 112): QQYNTYPRT

ALINHAMENTOS SÃO MOSTRADOS NAS FIGS 15 E 16

Exemplo 10

Estudo de primata não humano in vivo

10 Para avaliar a tolerância do mAb 1F5 anti-CD27 humano em
primatas não-humanos, 3 macacos cynomolgus foram tratados com uma dose

i.v. de 1, 3 ou 10 mg/kg de 1F5. Os animais foram seguidos por 29 dias. Os linfócitos totais (baseado em tamanho da dispersão de frente e lateral), células B de memória (CD20+ e CD95 claro) e monócitos (baseado no tamanho de dispersão para frente e lateral) foram corados com anticorpo anti-IgG humano (linha em negrito) e comparados a controles não corados (histograma sombreado). Os resultados são mostrados na Figura 17. Estes resultados mostram que o mAb 1F5 foi ligado à superfície de linfócitos em circulação conhecidos por expressar CD27 por toda a duração do estudo. Os monócitos, células que não expressam CD27 não tinham ligação 1F5.

Além disso, para determinar o efeito de 1F5 em populações de linfócito em circulação, os linfócitos foram corados com marcadores e o % de células positivas plotado vs tempo na Figura 17 para cada animal tratado em diferentes doses (pontos quadrados = 1 mg/kg; pontos circulares = 3 mg/kg; pontos triangulares = 10 mg/kg). Os resultados são mostrados na Figura 18.

Coletivamente, os resultados destes estudos, mostrado nas figuras 17 e 18, demonstram que 1F5 foi bem tolerada e não significativamente esgotam linfócitos circulantes (exceto que algum esgotamento transitório de células NK) após uma dose única de 1-10 mg/kg. Além disso, não havia nenhuma elevação da temperatura corporal e níveis não detectáveis de TNF- α , IL-6 ou IL-1 β .

Exemplo 11

Proliferação e ativação de célula T CD8+ específica de antígeno melhorado de mAbs anti-CD27

Manchamento de pentâmero em células de sangue periféricas de camundongo e esplenócitos.

Camundongos transgênicos com CD27 humano (Tg-huCD27) foram injetados por via intravenosa com 5mg de ovalbumina de galinha e o painel de anticorpos totalmente humanos reconhecendo CD27 humano gerado como no exemplo 1 (CD27 mAbs humana). Clone AT124 anti-CD27 de rato

e IgG1 humana irrelevante foram incluídos como controles positivos e negativos, respectivamente. Cada anticorpo (250 µg) foi co-injetado com ovalbumina no dia 0 e 250µg adicionais de anticorpo sozinho no dia 1. Células periféricas do sangue e de baço foram colhidas no dia 7. Esplenócitos (1 x 10⁶) ou sangue total (100 µl) foram utilizados para a manchamento. Após o bloqueio do receptor Fc, as células foram coradas com 10 µl de H-2Kb/SIINFEKL, um complexo tetramérico de MHC de camundongo complexado com o epítipo de célula T de peptídeo de ovalbumina (Beckman Coulter), ou uma pentamérica complexa semelhante (ProImmune), anti-CD8 (eBioscience) e mAb anti-huCD27 ou mAb anti-msCD27 (BD Biosciences) em temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram então lisadas por RBC, lavadas e fixadas, e pelo menos 100.000 eventos foram adquiridos em Flow Cytometer LSR (BD Biosciences). A fração de células positivas para tetrâmero ou pentâmero na população gated CD8⁺ ou CD27⁺ foi determinada. Os resultados são mostrados nas Figuras 19 e 21 a partir do qual pode ser observado que anticorpos anti-CD27 significativamente melhoraram as respostas imunes.

Exemplo 12

Ensaio ELISPOT

Esplenócitos (2,5 x 10⁵ e 0,5 x 10⁵) a partir da preparação de manchamento de pentâmero de Exemplo 8 acima foram colocados em placas revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN γ (mAb) em poços em triplicata após lise RBC. Peptídeo SIINFEKL foi adicionado a uma concentração final de 2µg/ml. Um controle de background foi ajustado para cada amostra em triplicata na ausência de peptídeo. O estímulo foi mantido durante a noite a 37° C em uma incubadora de cultura de tecidos. A detecção de ELISPOT foi executada usando um kit ELISPOT (BD Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante. Número de IFN γ -spot foi contado. Os resultados são mostrados nas Figuras 20 e 21, a partir do qual pode ser observado que mAbs anti-CD27

significativamente melhoraram a atividade de células T.

Exemplo 13

mAb Anti-CD27 melhora respostas de célula T a um antígeno de vacina

Camundongos transgênicos HuCD27 foram imunizados com 5
 5 µg (s.c.) da vacina direcionada para APC compreendendo um anticorpo IgG
 anti-DEC-205 de camundongo fundido a ovalbumina (OVA) (referenciada
 como α-mDEC-205-OVA), em combinação com o mAb 1F5 anti-CD27
 humano (i.p.) em diferentes doses (25, 50, 100, 200 ou 400 g). Uma semana
 mais tarde esplenócitos foram analisados para a reatividade de células T
 10 CD8+ para o peptídeo SIINFEKL OVA (OVA peptídeo 257-264) por
 manchamento de tetrâmero (% de tetrâmero positivo de todos os CD8+
 mostrado) e IFN- γ ELISPOT pelo procedimento descrito geralmente como
 exemplos 8 e 9, respectivamente. Os resultados são mostrados nas figuras
 22A-C, onde a Figura 22A mostra o protocolo usado, Figura 22B mostra os
 15 resultados de experimento de manchamento tetrâmero e Figura 22 C mostra
 os resultados do experimento de IFN-gama ELISPOT. Estes resultados
 indicam que o mAb 1F5 humano coadministrado melhorou significativamente
 as respostas de células T para o componente da vacina administrada.

Exemplo 14

20 Efeito sinérgico de mAb anti-CD27 (1F5) e agonista TLR (poli IC) em Respostas de célula T a vacina (anti-DEC205-OVA)

Camundongos Tg-huCD27 (transgênicos) e tipos selvagens
 (WT) littermates foram injetados intraperitonealmente com mAb 1F5 anti-
 CD27 (50 g) no dia -3 e, em seguida, por via subcutânea através de 4 patas
 25 injetadas com anti-mDec205-OVA (g 5) mais poli IC 0, 25, 50 ou 100 µg no
 dia 0. Baços foram coletados no dia 7 e avaliados por manchamento de
 tetrâmero, IFN γ ELISPOT e IFN γ -ICS. Média $\pm$ SD de IFN-ICS positivas
 entre células T CD8 gated de 3 camundongos por grupo foram calculados e
 um painel Dot Plots representativos foi coletado. Os resultados, mostrados na

Figuras 23A-D, indicam que o mAb humano anti-CD27 atuou sinergicamente com agonista TLR3 Poly IC para melhorar as respostas de células T para o componente da vacina administrada.

Exemplo 15

5 Administração do mAb anti-CD27 antes da vacina direcionada a Dec205 na ausência ou presença de agonista TLR

Camundongos huCD27-Tg e tipo selvagem (WT) littermates foram injetados intraperitonealmente com mAb anti-CD27 (50µg) em vários dias relacionadas com a vacina, conforme indicado na Figura 28 e por via
 10 subcutânea através de 4 patas injetadas com anti-mDec205-OVA (5 µg) mais ou menos agonista TLR poli IC-LC (20µg) no dia 0. Baços foram coletados no dia 7 e avaliados por manchamento de tetrâmero e IFN γ ELISPOT. Um painel representativo de manchamento de tetrâmero entre células T CD8 gated é mostrado nas figuras 24 e 25. IFN γ -ELISPOT mostrou um padrão
 15 semelhante.

Esses resultados mostram que, surpreendentemente, quando o anticorpo anti-CD27 é administrado em combinação com uma vacina na presença ou ausência do agonista TLR, a ativação de células T é maior quando o anticorpo é administrado antes da vacina, por exemplo, um dia ou
 20 mais antes da vacina (antígeno) ser administrada.

Exemplo 16

mAb anti-CD27 combinado com ativação de TCR ativa células T de camundongos transgênicos com CD27 humano

Para avaliar a capacidade de ativação de célula T de 1F5 mAb,
 25 as células T foram purificadas de baços de camundongos hCD27-Tg por seleção negativa com pérolas. As células foram marcadas com CFSE e incubadas com 0,2µg/ml de mAb 1F5 humano anti-CD27 ou isotipo controle durante 3 dias. O IgG anti-humano de ligação cruzada foi passado através de uma coluna de remoção de endotoxinas antes do uso. IFN γ -ICS e CFSE

diluição entre células T CD8 e CD4 são mostrados nas Figuras 26 e 27. TNF- α -ICS mostraram o mesmo padrão de IFN- γ . Como mostrado na Figura 26 e 27, quando combinado com a ativação de TCR, mAb 1F5 efetivamente induz a proliferação de células T *in vitro*. Os dados mostram que a ligação cruzada com anti-IgG humano e ativação de receptor de células T com mAb anti-CD3 foram necessários para a produção de citocina e proliferação induzida por 1F5.

Exemplo 17

mAb anti-CD27 aumenta a eficácia da vacina em um modelo de desafio de Melanoma MO4

Para avaliar a atividade antitumoral *in vivo*, huCD27 Tg e WT controle, 8 camundongos por grupo, foram inoculados por via subcutânea com $0,3 \times 10^5$ células de MO4 no dia 0. No dia 5 e 12, estes camundongos foram injetados intraperitonealmente com mAb 1F5 anti-CD27 (50 μ g); no dia 8 e 15, doses adicionais de CD27 HuMab (50 μ g) e vacinados com anti-mDec205-OVA (5 g). O crescimento do tumor foi medido com pinças 2 vezes por semana. Os resultados são mostrados na Figura 24.

Em outro estudo, huCD27 Tg e WT controle, 5 camundongos por grupo, foram inoculados por via subcutânea com 1×10^5 células de MO4 no dia 0. No dia 5 e 12, estes camundongos foram vacinados com anti-mDec205-OVA (5 μ g) mais o agonista TLR poli IC-LC (10 μ g) intraperitonealmente. Nos dias 6 e 13, os camundongos foram injetados com mAb 1F5 anti-CD27 (50 μ g). O crescimento do tumor foi medido com pinças 2 vezes por semana conforme indicado no protocolo ilustrado na Figura 28A. Os resultados, mostrados nas figuras 28B, C e D, mostram o efeito de nenhum tratamento (Figura 28B), tratamento de vacina sozinha (Figura 28 C) ou tratamento de vacina em combinação com tratamento anti-CD27 (Figura 28 D) no tamanho do tumor nos camundongos em função do número de dias após inoculação de tumor. Os resultados demonstram que o tratamento de

combinação com mAb anti-CD27 (1F5) significativamente prolongou a sobrevivência camundongos desafiados com o tumor.

Exemplo 18

1F5 apresenta potente atividade anti-tumoral em modelo de desafio de tumor em camundongo transgênico de linfoma BCL₁-B

Para avaliar a atividade antitumoral *in vivo* de 1F5, grupos de 9-10 camundongos transgênicos hCD27 (Balb/c fundo) foram desafiados com 10⁷ células de linfoma BCL₁ B, administradas por via intravenosa no dia 0. Os animais, em seguida, foram tratados com 5 doses de mAb 1F5 anti-CD27 humano conforme indicado. Como mostrado na figuras 29A e 29B, significativamente prolongou a sobrevivência de camundongos desafiados de tumor, de uma forma dependente da dose.

Exemplo 19

Morte de tumor em modelo de camundongo SCID de Xenoenxerto de Raji

Camundongos CB.17 SCID (adquiridos de Taconic) foram mantidos em uma instalação de camundongos isenta de patógenos. Células de Linfoma Raji (1 x 10⁵) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID, 4 camundongos por grupo. No dia 6, estes camundongos foram tratados com mAbs CD27 humanos via administração intraperitoneal, 0.5 mg por dose e dosado duas vezes por semana por 3 semanas. O crescimento do tumor foi medido com pinças 3 vezes por semana. Os resultados de crescimento do tumor e análise de Kaplan-Meier são mostrados nas Figuras 30A e 30B, da qual pode ser observado que mAbs anti-CD27 significativamente prolongaram a sobrevivência de camundongos desafiados com tumor.

Em outro experimento, camundongos CB.17 SCID (adquiridos de Taconic) foram mantidos em uma instalação de camundongos isenta de patógenos. Células de Linfoma Raji humanas (5 x 10⁵) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID, no dia 0, 6 camundongos por grupo.

No dia 5, estes camundongos foram tratados com mAb 1F5 anti-CD27 via administração intraperitoneal, 0,033, 0,1 ou 0,3 mg por dose e dosado duas vezes por semana por 3 semanas. O crescimento do tumor foi medido com pinças 2 vezes por semana.

- 5 Os resultados, mostrados na Figura 31A, indicam que o mAb anti-CD27 (1F5) inibiu significativamente o crescimento do tumor e, assim, significativamente prolongou a sobrevivência de camundongos desafiados com tumor. Uma curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de dados também é fornecida na Figura 31B, que mostra que a sobrevida mediana foi aumentada em pelo menos 10 dias em camundongos do grupo tratado em relação ao grupo controle. Um experimento de xenoenxertos adicional foi conduzido com 1G5 e os resultados são mostrados na Figura 32.

Exemplo 20

Morte de tumor em modelo de camundongo SCID de Xenoenxerto de Daudi

- 15 Camundongos CB.17 SCID (adquiridos de Taconic) foram mantidos em uma instalação de camundongos isenta de patógenos. Células de Linfoma Daudi humanas (1×10^6) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID, no dia 0, 6 camundongos por grupo. No dia 5, estes camundongos foram tratados com mAb 1F5 anti-CD27 via administração intraperitoneal, 0,033, 0,1 ou 0,3 mg por dose e dosado duas vezes por semana por 3 semanas. O crescimento do tumor foi medido com pinças 2 vezes por semana.

- 20 Os resultados, mostrados na Figura 33, indicam que o mAb anti-CD27 (1F5) inibiu significativamente o crescimento do tumor (Figura 33A) e, assim, significativamente prolongou a sobrevivência de camundongos desafiados com tumor (curva Kaplan-Meier na Figura 33B).

Exemplo 21

mAb anti-CD27 projetado para não ligar a receptores Fc não aumentam a resposta de célula T a um antígeno de vacina

Camundongos transgênicos HuCD27 foram imunizados com 5 μ g (s.c.) da vacina direcionada para APC compreendendo um anticorpo IgG anti-DEC-205 de camundongo fundido a ovalbumina (OVA) (referenciada como α -mDEC-205-OVA), em combinação com o mAb 1F5 anti-CD27 humano (i.p.) ou mAb 1F5 mutante (porção Fc mutada para impedir a ligação ao receptor Fc) ou mAb IgG controle. Uma semana mais tarde os esplenócitos foram analisados para a reatividade de células T CD8+ para o peptídeo OVA SIINFEKL (peptídeo OVA 257-264) por IFN- γ ELISPOT pelo procedimento como descrito geralmente.

Os resultados, mostrados na Figura 34, demonstram que o mAb 1F5 humano alterado não melhoram as respostas de células T para a vacina e assim seria um agente efetivo para bloquear a via CD70/CD27.

Equivalentes

Os especialistas na técnica reconhecerão, ou estão aptos a verificar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das modalidades específicas da invenção descrita aqui. Ditos equivalentes se destinam a estar incluídos pelas seguintes reivindicações.

Sumário da listagem de sequência

SEQ ID NO:	DESCRIÇÃO
1	CD27 humano (N.º de Acesso de Banco de Gene.: AAH12160,1)
2	CD70 Humano (N.º de Acesso de Banco de Gene.: NP_001243)
3	Sequência VH 3-33 linhagem germinativa é fornecida (N.º de Acesso de Banco de Gene AAP44382)
4	Sequência VH 3-7 linhagem germinativa é fornecida (N.º de Acesso de Banco de Gene AAP44389)
5	3H8-1B11 VH ácido nucleico
6	3H8-1B11 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
7	3H8-1B11 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
8	3H8-1B11 VH CDR1 Aminoácido
9	3H8-1B11 VH CDR2 Aminoácido
10	3H8-1B11 VH CDR3 Aminoácido
11	3H8-1B11 VL #2 ácido nucleico
12	3H8-1B11 VL #2 aminoácido incluindo peptídeo sinal
13	3H8-1B11 VL #2 aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
14	3H8-1B11 VL #2 CDR1 aminoácido
15	3H8-1B11 VL #2 CDR2 aminoácido
16	3H8-1B11 VL #2 CDR3 aminoácido
17	3H8-1B11 VL #3 ácido nucleico
18	3H8-1B11 VL #3 aminoácido incluindo peptídeo sinal
19	3H8-1B11 VL #3 aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
20	3H8-1B11 VL #3 CDR1 aminoácido
21	3H8-1B11 VL #3 CDR2 aminoácido
22	3H8-1B11 VL #3 CDR3 aminoácido
23	2C2-1A10 VH ácido nucleico
24	2C2-1A10 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
25	2C2-1A10 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
26	2C2-1A10 VH CDR1 aminoácido
27	2C2-1A10 VH CDR2 aminoácido
28	2C2-1A10 VH CDR3 aminoácido
29	2C2-1A10 VL ácido nucleico
30	2C2-1A10 VL aminoácido incluindo peptídeo sinal
31	2C2-1A10 VL aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
32	2C2-1A10 VL CDR1 aminoácido
33	2C2-1A10 VL CDR2 aminoácido

SEQ ID NO:	DESCRIÇÃO
34	2C2-1A10 VL CDR3 aminoácido
35	1F5-1H5 VH ácido nucleico
36	1F5-1H5 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
37	1F5-1H5 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
38	1F5-1H5 VH CDR1 aminoácido
39	1F5-1H5 VH CDR2 aminoácido
40	1F5-1H5 VH CDR3 aminoácido
41	1F5-1H5 VL #2 ácido nucleico
42	1F5-1H5 VL #2 aminoácido incluindo peptídeo sinal
43	1F5-1H5 VL #2 aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
44	1F5-1H5 VL #1 CDR1 aminoácido
45	1F5-1H5 VL #2 CDR2 aminoácido
46	1F5-1H5 VL #2 CDR3 aminoácido
47	1H8-B4 VH ácido nucleico
48	1H8-B4 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
49	1H8-B4 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
50	1H8-B4 VH CDR1 aminoácido
51	1H8-B4 VH CDR2 aminoácido
52	1H8-B4 VH CDR3 aminoácido
53	1H8-B4 VL ácido nucleico
54	1H8-B4 VL aminoácido incluindo peptídeo sinal
55	1H8-B4 VL aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
56	1H8-B4 VL CDR1 aminoácido
57	1H8-B4 VL CDR2 aminoácido
58	1H8-B4 VL CDR3 aminoácido
59	1G5-1B9 VH ácido nucleico
60	1G5-1B9 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
61	1G5-1B9 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
62	1G5-1B9 VH CDR1 aminoácido
63	1G5-1B9 VH CDR2 aminoácido
64	1G5-1B9 VH CDR3 aminoácido
65	1G5-1B9 VL ácido nucleico
66	1G5-1B9 VL aminoácido incluindo peptídeo sinal

SEQ ID NO:	DESCRIÇÃO
67	1G5-1B9 VL aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
68	1G5-1B9 VL CDR1 aminoácido
69	1G5-1B9 VL CDR2 aminoácido
70	1G5-1B9 VL CDR3 aminoácido
71	2G9-1D11 VH ácido nucleico
72	2G9-1D11 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
73	2G9-1D11 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
74	2G9-1D11 VH CDR1 aminoácido
75	2G9-1D11 VH CDR2 aminoácido
76	2G9-1D11 VH CDR3 aminoácido
77	2G9-1D11 VL ácido nucleico
78	2G9-1D11 VL aminoácido incluindo peptídeo sinal
79	2G9-1D11 VL aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
80	2G9-1D11 VL CDR1 aminoácido
81	2G9-1D11 VL CDR2 aminoácido
82	2G9-1D11 VL CDR3 aminoácido
83	3A10-1G10 VH ácido nucleico
84	3A10-1G10 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
85	3A10-1G10 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
86	3A10-1G10 VH CDR1 aminoácido
87	3A10-1G10 VH CDR2 aminoácido
88	3A10-1G10 VH CDR3 aminoácido
89	3A10-1G10 VL #1 ácido nucleico
90	3A10-1G10 VL #1 aminoácido incluindo peptídeo sinal
91	3A10-1G10 VL #1 aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
92	3A10-1G10 VL #1 CDR1 aminoácido
93	3A10-1G10 VL #1 CDR2 aminoácido
94	3A10-1G10 VL #1 CDR3 aminoácido
95	3A10-1G10 VL #4 ácido nucleico
96	3A10-1G10 VL #4 aminoácido incluindo peptídeo sinal
97	3A10-1G10 VL #4 aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
98	3A10-1G10 VL #4 CDR1 aminoácido
99	3A10-1G10 VL #4 CDR2 aminoácido

SEQ ID NO:	DESCRIÇÃO
100	3A10-1G10 VL #4 CDR3 aminoácido
101	3H12-1E12 VH ácido nucleico
102	3H12-1E12 VH aminoácido incluindo peptídeo sinal
103	3H12-1E12 VH aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
104	3H12-1E12 VH CDR1 aminoácido
105	3H12-1E12 VH CDR2 aminoácido
106	3H12-1E12 VH CDR3 aminoácido
107	3H12-1E12 VL #2 ácido nucleico
108	3H12-1E12 VL #2 aminoácido incluindo peptídeo sinal
109	3H12-1E12 VL #2 aminoácido “maduro” excluindo peptídeo sinal
110	3H12-1E12 VL #2 CDR1 aminoácido
111	3H12-1E12 VL #2 CDR2 aminoácido
112	3H12-1E12 VL #2 CDR3 aminoácido
113	VH CDR3 consenso
114	VL CDR3 consenso
115	VH CDR2 consenso
116	VL CDR2 consenso
117	VH CDR1 consenso
118	VL CDR1 consenso

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano ou humanizado isolado que se liga a CD27 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo apresente pelo menos uma das seguintes propriedades:

5 (a) bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 em pelo menos cerca de 70% em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml;

(b) liga a CD27 humana com uma constante de dissociação de equilíbrio K_d de 10^{-9} M ou menos, ou alternativamente, uma constante de associação de equilíbrio K_a de 10^{+9} M⁻¹ ou mais;

10 (c) induz citotoxicidade mediada por complemento específica (CDC) de células que expressam CD27 de pelo menos 10% em uma concentração de anticorpo de 3 µg/ml e aproximadamente 6% complemento de soro de coelho;

(d) induz lise específica de citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) de células que expressam CD27 de pelo menos 10% em uma concentração de anticorpo de 3 µg/ml e proporção de efector: células alvo de 75:1 ;

(e) melhora sobrevivência média em pelo menos 20% em imunodeficiência combinada grave (SCID) em camundongos após inoculação de célula de tumor *in vivo* (5×10^5 células Raji ou 1×10^6 células Daudi) quando administrado a 0,3mg (i.p.) pelo menos duas vezes por semana por 3 semanas comparado a camundongos aos quais o anticorpo não é administrado;

25 (f) induz ou intensifica resposta imune específica de antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;

(g) induz ou intensifica resposta imune TH1 específica de antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;

(h) induz ou intensifica proliferação ou ativação de célula T específica de antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno

endógeno;

(i) reduz ou inibe proliferação ou ativação de célula T;

(j) induz ou intensifica atividade de célula T quando combinado com ativação de TCR simultânea, separada ou sequencial;

5 (k) bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 em pelo menos cerca de 70% em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml e reduz ou inibe a ativação de célula T quando não é capaz de se ligar a, ou contendo ligação reduzida a receptores Fc;

10 (l) resulta em menos do que 50% de esgotamento de células T CD3+ (além de células NK) em macacos quando administrado a 3 mg/kg (i.v.) pelo período de 29 dias imediatamente após a administração; ou

(m) resulta em menos do que 50% de esgotamento de células B de memória em macacos quando administrados a 3 mg/kg (i.v.) pelo período de 29 dias imediatamente após a administração.

15 2. Anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de que se liga a CD27 humana e induz ou intensifica ativação ou proliferação de células T CD8+.

3. Anticorpo monoclonal humano ou humanizado isolado que se liga a CD27 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo:

20 (a) induz ou intensifica respostas imunes específicas de antígeno *in vivo* em combinação com uma vacina ou antígeno endógeno;

(b) induz ou intensifica atividade de célula T quando combinado com ativação de TCR simultânea, separada ou sequencial;

25 (c) resulta em menos do que 50% de esgotamento de células T CD3+ (que não células NK) em macacos quando administrado a 3 mg/kg (i.v.) pelo período de 29 dias imediatamente em seguida a administração; e

(d) resulta em menos do que 50% de esgotamento de células B de memória em macacos quando administrado a 3 mg/kg (i.v.) pelo período de 29 dias imediatamente em seguida a administração.

4. Anticorpo monoclonal humano ou humanizado isolado que se liga a CD27 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo melhora a sobrevivência mediana em pelo menos 20% em camundongos de imunodeficiência combinada grave (SCID) após inoculação em célula de tumor *in vivo* (5×10^5 células Raji ou 1×10^6 células Daudi) quando administrado a 0,3mg (i.p.) pelo menos duas vezes por semana por 3 semanas em comparação com camundongos aos quais o anticorpo não é administrado.

5. Anticorpo monoclonal humano ou humanizado isolado que se liga a CD27 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo:

(a) bloqueia a ligação de sCD70 a CD27 em pelo menos cerca de 70% em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml;

(i) reduz ou inibe proliferação ou ativação de célula T; e

(k) reduz ou inibe a atividade de célula T quando não capaz de ligação a, tendo ligação reduzida a, receptores Fc.

6. Molécula biespecífica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ligado a uma segunda molécula tendo uma especificidade de ligação que é diferente do anticorpo.

7. Anticorpo monoclonal isolado que se liga a CD27 humana e inibe a ligação de CD70 a CD27 em células, caracterizado pelo fato de que o anticorpo inibe a ligação de sCD70 a células que expressam CD27 por pelo menos cerca de 70% em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml e inibe ou reduz uma resposta imune a um antígeno.

8. Anticorpo monoclonal isolado que se liga a CD27 humana e induz ou intensifica a função de célula efetora, caracterizado pelo fato de que o anticorpo induz pelo menos cerca de 40% Lise específica de ADCC de células que expressam CD27 em uma concentração de anticorpo de 10 µg/ml ou induz pelo menos cerca de 40% de citotoxicidade por complemento (CDC) de células que expressam CD27 em uma concentração de 10 µg/ml.

9. Anticorpo monoclonal isolado que se liga a CD27 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende:

(i) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 38;

5 uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 39;

 uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 40;

10 uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 44;

 uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 45; e

 uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 46;

15 (ii) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 50;

 uma CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 51;

20 uma CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 52;

 uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 56;

 uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 57; e

25 uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 58;

 (iii) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 104;

 uma CDR2 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 105;

uma CDR3 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 106;

uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo

5 SEQ ID NO: 110;

uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo

SEQ ID NO: 111; e

uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo

SEQ ID NO: 112;

10 (iv) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 86;

uma CDR2 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 87;

uma CDR3 de região variável de cadeia pesada

15 compreendendo SEQ ID NO: 88;

uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo

SEQ ID NO: 92 ou 98;

uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo

SEQ ID NO: 93 ou 99; e

20 uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 94 ou 100;

(v) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 26;

uma CDR2 de região variável de cadeia pesada

25 compreendendo SEQ ID NO: 27;

uma CDR3 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 28;

uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo

SEQ ID NO: 32;

uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 33; e

uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 34;

5 (vi) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 74;

uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 75;

10 uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 76;

uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 80;

uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 81; e

15 uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 82;

(vii) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 8;

20 uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 9;

uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 10;

uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 14 ou 20;

25 uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 15 ou 21; e

uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 16 ou 22; ou

(viii) uma CDR1 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 62;

uma CDR2 de região variável de cadeia pesada
compreendendo SEQ ID NO: 63;

uma CDR3 de região variável de cadeia pesada
5 compreendendo SEQ ID NO: 64;

uma CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 68;

uma CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 69; e

10 uma CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo
SEQ ID NO: 70.

10. Anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de
que se liga a CD27 humana e compreende:

15 (a) uma região variável de cadeia pesada compreendendo uma
sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à sequência de
aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 6, 7, 24, 25,
36, 37, 48, 49, 60, 61, 72, 73, 84, 85, 102 e 103; ou

(b) uma região variável de cadeia leve compreendendo uma
sequência de aminoácido que é pelo menos 90% idêntica à sequência de
20 aminoácido selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 12, 13, 18,
19, 30, 31, 42, 43, 54, 55, 66, 67, 78, 79, 90, 91, 96, 97, 108 e 109.

11. Anticorpo monoclonal isolado, caracterizado pelo fato de
que se liga a CD27 humana e compreende uma região variável de cadeia
pesada e/ou uma região variável de cadeia leve compreendendo uma
25 sequência de aminoácido pelo menos 90% idêntica às sequências de
aminoácido selecionadas do grupo que consiste em:

(a) SEQ ID NOs: 37 e/ou 43, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 49 e/ou 55, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 103 e/ou 109, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs: 85 e/ou 91, respectivamente;

(e) SEQ ID NOs: 85 e/ou 97, respectivamente;

(f) SEQ ID NOs: 25 e/ou 31, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs: 73 e/ou 79, respectivamente;

5 (h) SEQ ID NOs: 7 e/ou 13, respectivamente;

(i) SEQ ID NOs: 7 e/ou 19, respectivamente; e

(j) SEQ ID NOs: 61 e/ou 67, respectivamente.

10 12. Anticorpo isolado, caracterizado pelo fato de que compete para ligação a CD27 humana ou liga-se ao mesmo epítipo ligado pelo anticorpo da reivindicação 11.

13. Anticorpo monoclonal isolado que se liga a CD27 humana, caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve codificadas por sequências de ácido nucleico selecionadas do grupo que consiste em:

15 (a) SEQ ID NOs: 5 e 11, respectivamente;

(b) SEQ ID NOs: 5 e 17, respectivamente;

(c) SEQ ID NOs: 23 e 29, respectivamente;

(d) SEQ ID NOs: 35 e 41, respectivamente;

(e) SEQ ID NOs: 47 e 53, respectivamente;

20 (f) SEQ ID NOs: 59 e 65, respectivamente;

(g) SEQ ID NOs: 71 e 77, respectivamente;

(h) SEQ ID NOs: 83 e 89,

(i) SEQ ID NOs: 83 e 95; e

(j) SEQ ID NOs: 101 e 107, respectivamente

25 ou sequências de ácido nucleico contendo pelo menos 90% identidade às sequências de ácido nucleico de (a) a (j).

14. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica a região variável da cadeia pesada e/ou da cadeia leve do anticorpo como definido em qualquer

uma das reivindicações 1 a 13.

15. Célula transformada, caracterizada pelo fato de que é com um vetor de expressão como definido na reivindicação 14.

5 16. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humano, humanizado ou quimérico.

17. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou molécula biespecífica como definido(a) em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

10 18. Composição de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um adjuvante e/ou um agente imunoestimulatório.

15 19. Composição de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelo fato de que o agente imunoestimulatório é selecionado do grupo que consiste em ligante CD40, ligante FLT 3, citocinas, fatores estimuladores de colônia, um anticorpo anti-CTLA-4, LPS (endotoxina), ssRNA, dsRNA, Bacilo Calmette-Guerin (BCG), cloridrato de Levamisole, imunoglobulinas intravenosas e um agonista de receptor similar a Toll (TLR).

20 20. Composição de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o agonista de receptor similar a Toll é selecionado do grupo que consiste em um agonista TLR3, um agonista TLR4, um agonista TLR5, um agonista TLR7, um agonista TLR8 e um agonista a TLR9.

25 21. Composição de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que ainda compreende um agente imunossupressor, outro anticorpo e/ou um antígeno.

22. Composição de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que o antígeno compreende um componente de um patógeno, um antígeno de tumor, alérgeno ou um autoantígeno.

23. Composição de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o antígeno de tumor é selecionado do grupo que consiste em β hCG, gp100 ou Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO58, MN (gp250), idiótipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, Tirosinase, Telomerase, antígenos SSX2, antígenos MUC-1, e antígenos de tumor derivados de célula germinativa.

24. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de ser para manufatura de um medicamento para induzir ou intensificar uma resposta imune contra um antígeno em um indivíduo.

25. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de ser para manufatura de um medicamento para inibir o crescimento de células que expressam CD27.

26. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de que é para manufatura de um medicamento para tratar um câncer selecionado do grupo que consiste em leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica mielomonocítica de promielócito, leucemia crônica, leucemia mielocítica crônica (granulocítica), leucemia linfocítica crônica, linfoma de célula de manto, linfoma de sistema nervoso central primário, linfoma de Burkitt, linfoma de célula B de zona marginal, Linfoma vera Policitemia, doença de Hodgkin, doença de não Hodgkin, mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença de cadeia pesada, tumores sólidos, sarcomas e carcinomas, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, osteossarcoma, cordoma, angiossarcoma, endoteliossarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliossarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing,

leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, sarcoma de cólon, carcinoma colorretal, câncer pancreático, câncer de mama, câncer ovariano, câncer de próstata, carcinoma de célula escamosa, carcinoma de célula basal, adenocarcinoma, carcinoma de glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de célula renal, hepatoma, carcinoma de duto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilm, câncer cervical, câncer uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de célula pequena, carcinoma pulmonar de célula não pequena, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craniofaringeoma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma de célula basal, câncer de trato biliar, câncer de bexiga, câncer de osso, câncer de sistema nervoso central (CNS) e cérebro, câncer cervical, coriocarcinoma, cânceres colorretais, câncer de tecido conectivo, câncer do sistema digestivo, câncer endometrial, câncer esofágico, câncer de olho, câncer de cabeça e pescoço, câncer gástrico, neoplasma intraepitelial, câncer de rim, câncer de laringe, câncer de fígado, câncer pulmonar (célula pequena, célula grande), melanoma, neuroblastoma; câncer de cavidade oral (por exemplo, lábio, língua, boca e faringe), câncer ovariano, câncer pancreático, retinoblastoma, rabdomiossarcoma, câncer retal; câncer do sistema respiratório, sarcoma, câncer de pele, câncer de estômago, câncer testicular, câncer de tireoide, câncer uterino, e câncer do sistema urinário.

25 27. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de que é para manufatura de um medicamento para tratar distúrbios que consistem em doenças bacterianas, fúngicas, virais e infecciosas parasíticas.

28. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das

reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de que é para manufatura de um medicamento para inibir a ligação de CD70 a CD27 nas células de um indivíduo tendo um distúrbio.

29. Uso de um anticorpo como definido em qualquer uma das
5 reivindicações 1 a 58 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de que é para manufatura de um medicamento para regulação negativa de uma resposta de célula T em um indivíduo tendo um distúrbio.

30. Uso de de um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5 ou 7 a 13, caracterizado pelo fato de ser para
10 manufatura de um medicamento para tratar um distúrbio selecionado do grupo que consiste em rejeição de enxerto, alergia e uma doença autoimune.

31. Uso de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a doença autoimune é selecionada do grupo que consiste em esclerose múltipla, artrite reumatoide, diabetes tipo 1, psoríase, doença de
15 Crohn e outras doenças intestinais inflamatórias, tal como colite ulcerativa, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), encefalomielite autoimune, miastenia gravis (MG), tireoidite de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pênfigo, doença de Graves, anemia hemolítica autoimune, púrpura trombocitopênica autoimune, escleroderma com anticorpos anti-colágeno, doença de tecido
20 conectivo misto, polipiosite, anemia perniciosa, doença de Addison idiopática, infertilidade associada a autoimune, glomerulonefrite, glomerulonefrite crescêntica, glomerulonefrite proliferativa, pênfigo bolhoso, síndrome de Sjogren, artrite psoriática, resistência a insulina, diabetes mellitus autoimune, hepatite autoimune, hemofilia autoimune, síndrome
25 linfoproliferativa autoimune (ALPS), hepatite autoimune, hemofilia autoimune, síndrome linfoproliferativa autoimune, uveoretinite autoimune, síndrome de Guillain-Barré, arteriosclerose e doença de Alzheimer.

Análise Biacore de mAbsCD27 Humanos

Clone	Tempo de dissociação (s)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU) Fc2-1	Rmax(RU) Fc4-3	KA (1/M)	KD(M)
1G5	480	2.23E+05	8.98E-05	236	177	2.55E+09	4.02E-10
1H8	480	2.18E+05	3.44E-05	313	226	6.39E+09	1.58E-10
3H12	480	1.74E+05	6.23E-05	298	205	2.80E+09	3.58E-10
3H8	1200	1.12E+05	6.19E-06	126	96	1.81E+10	5.56E-11
2G9	1200	1.74E+05	2.65E-07	97	75	6.60E+11	1.53E-12
1F5	480	3.07E+05	5.72E-05	312	206	5.37E+09	1.86E-10
3A10	480	1.74E+06	3.51E-04	113	79	4.97E+09	2.02E-10
2C2	480	5.03E+05	4.23E-05	54	40	1.20E+10	8.41E-11

Fig. 1

Ligação a rCD27-Fc por ELISA
Gráfico #1

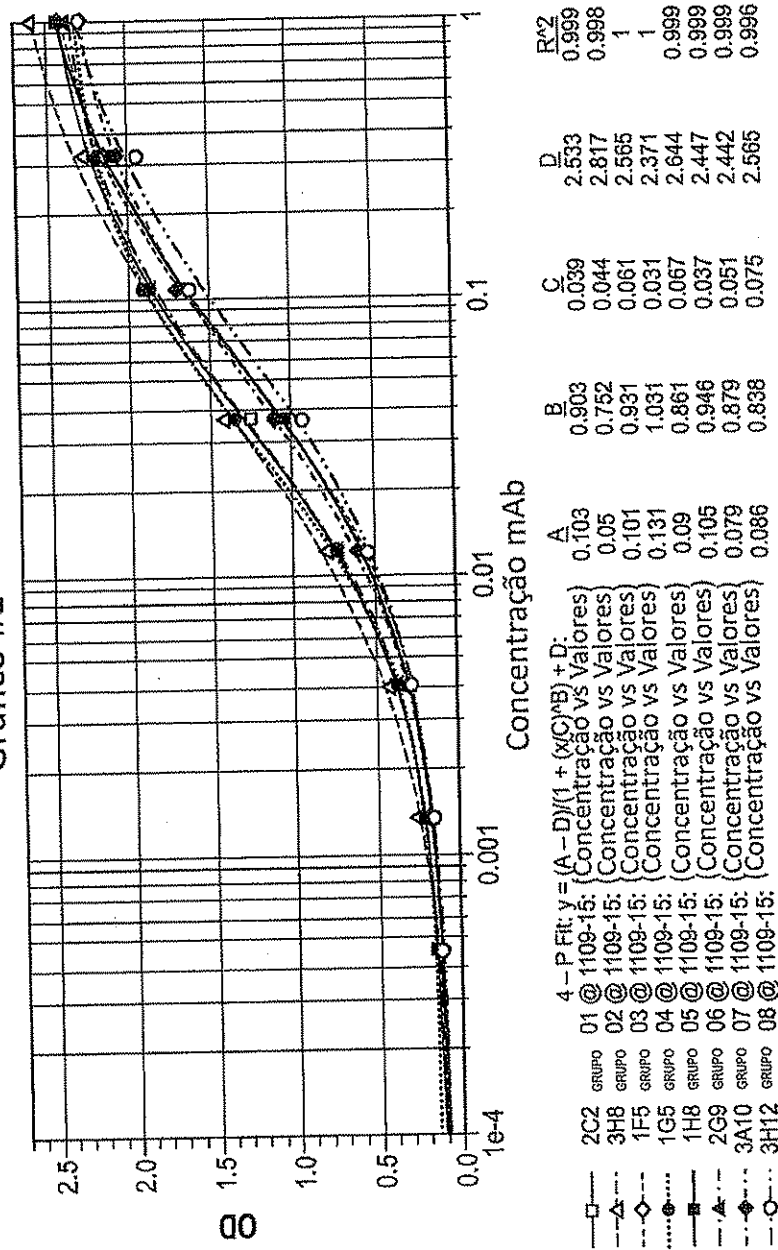
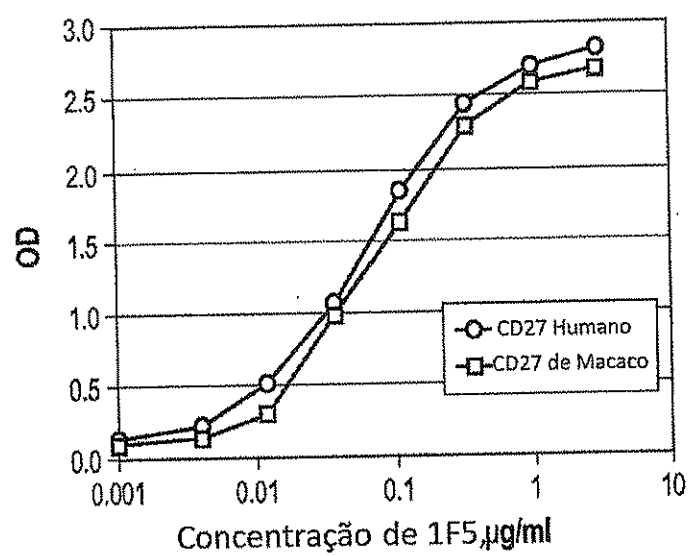
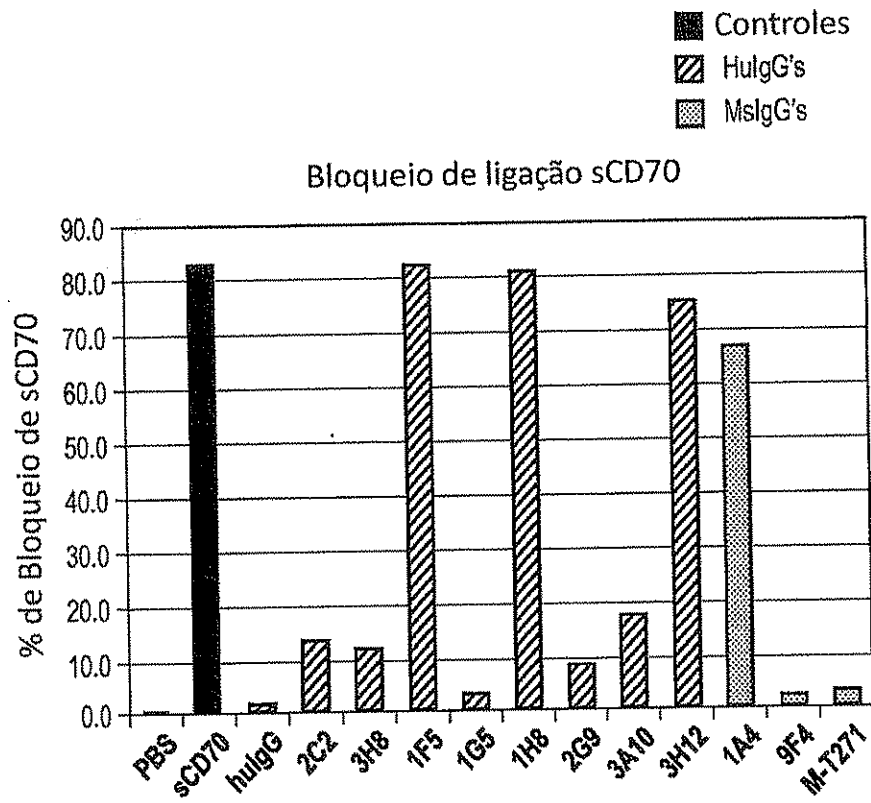


Fig. 2

OPÇÃO DE ADEQUAÇÃO da curva - VALOR DE PESO FIXO: 1

**Fig. 3**

**Fig. 4**

mAb 1F5 humana é principal candidato a desenvolvimento

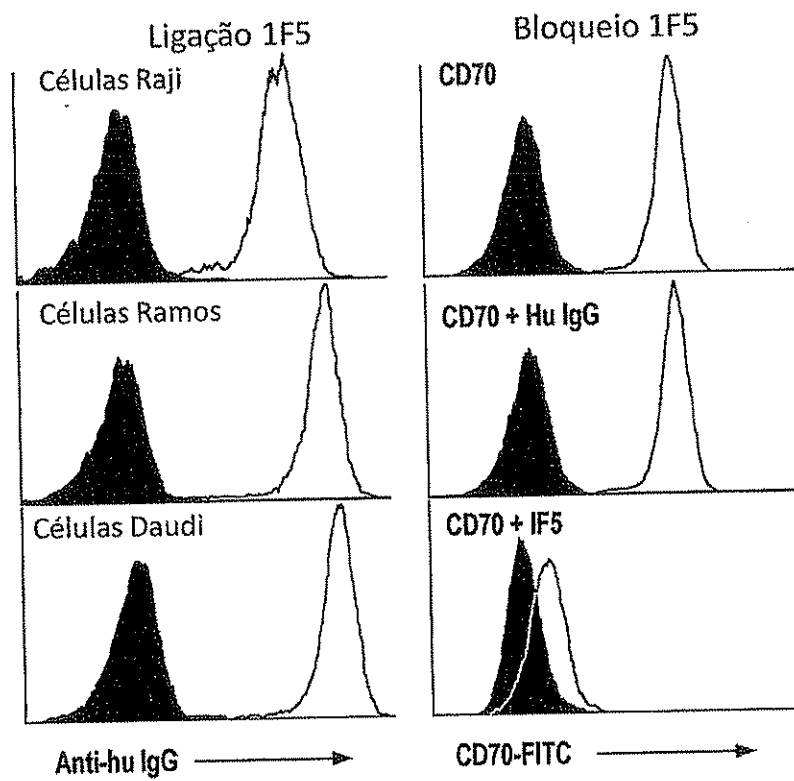
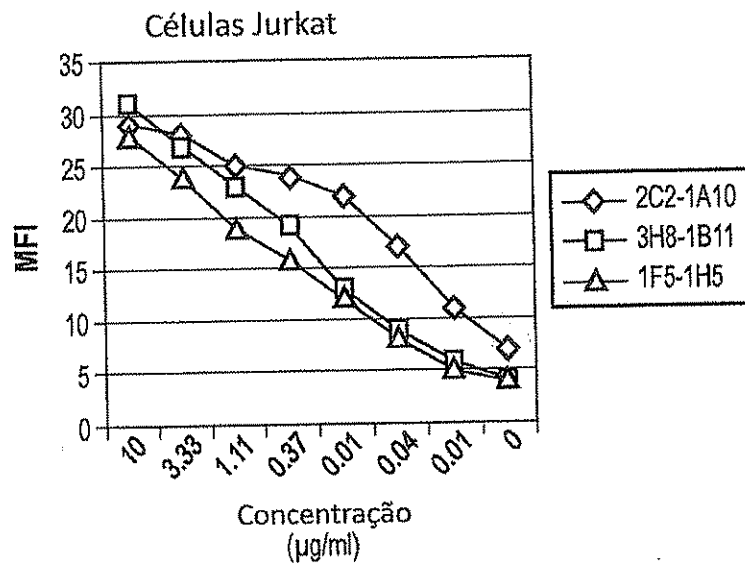
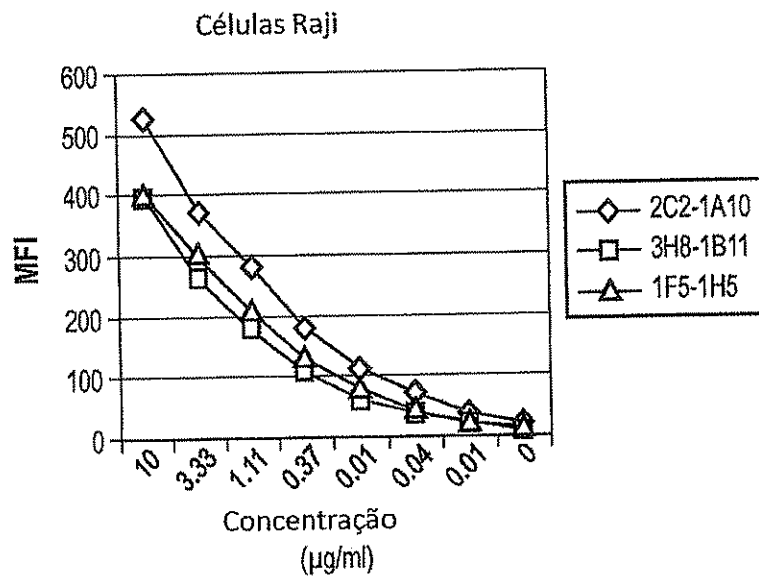
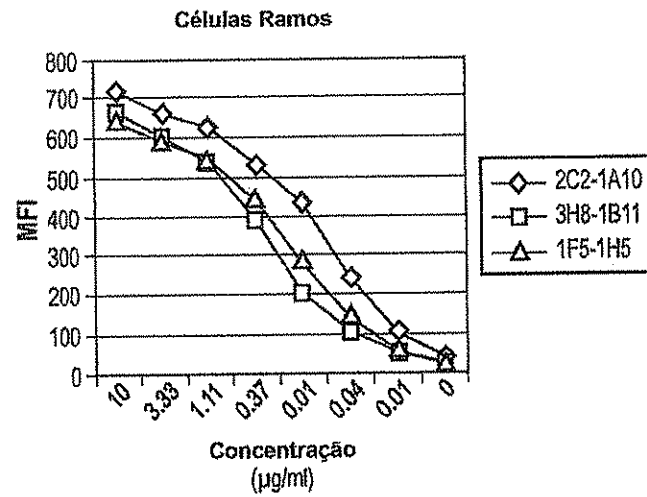
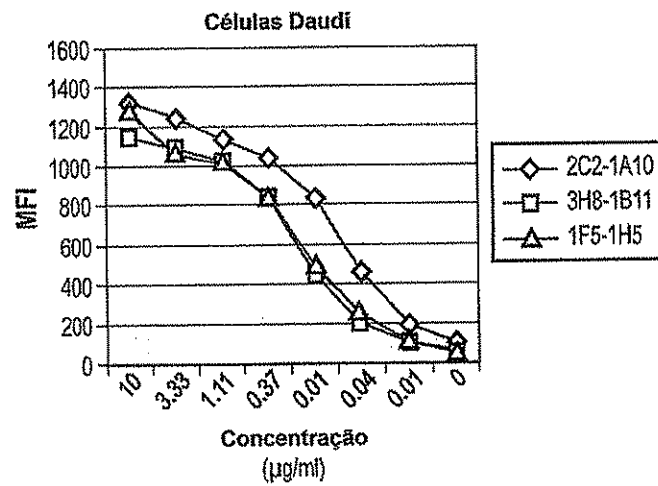
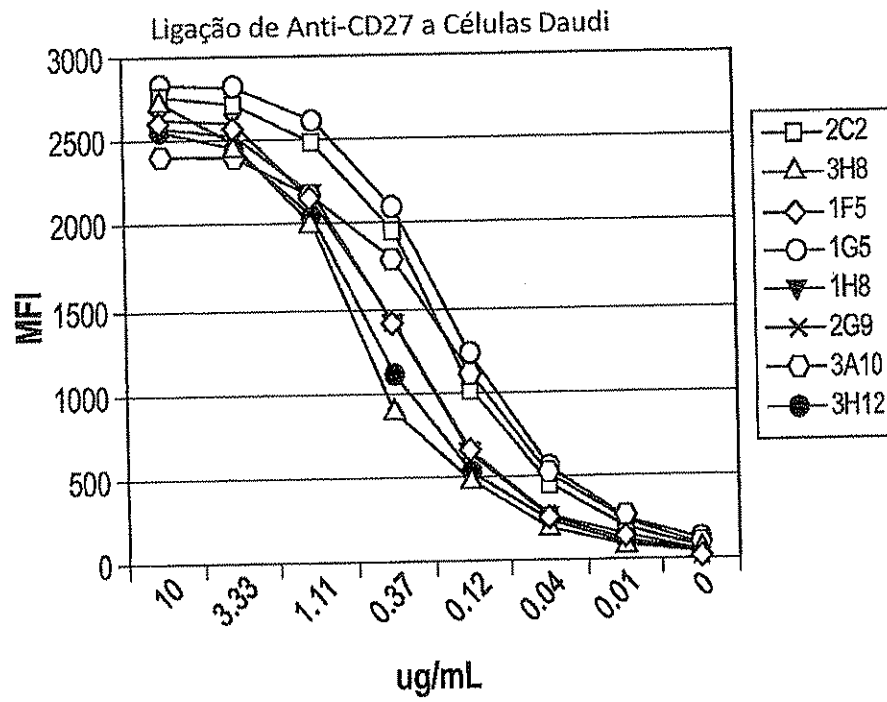


Fig. 5

**Fig. 6A****Fig. 6B**

**Fig. 6C****Fig. 6D**

**Fig. 7**

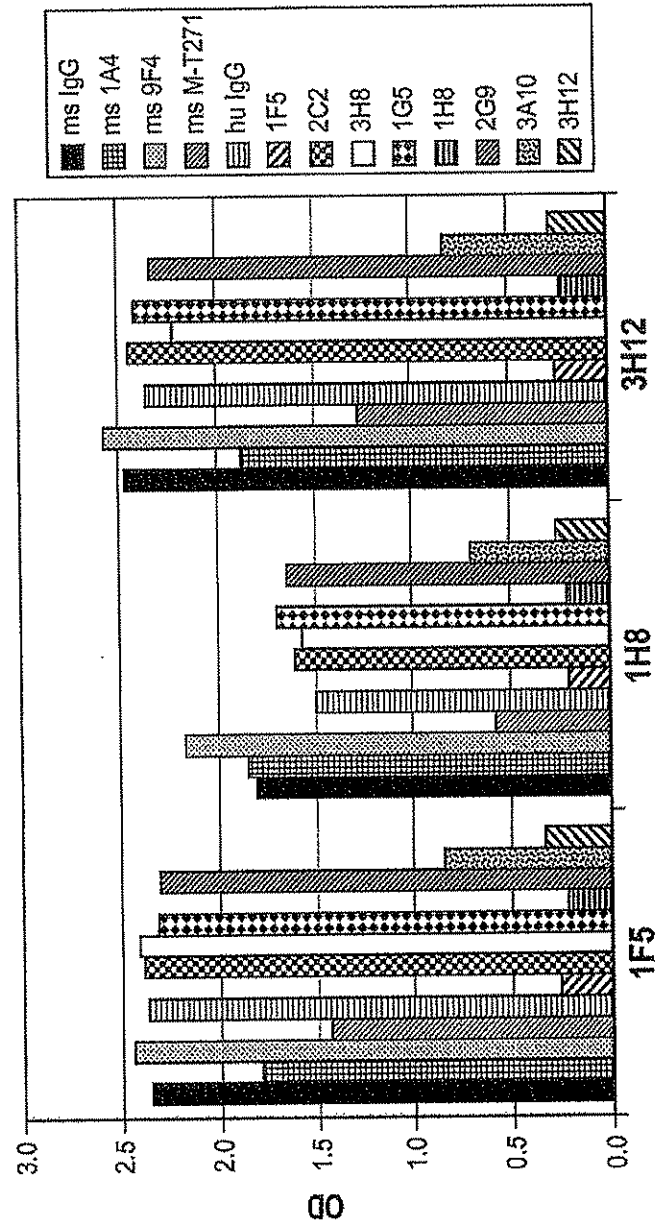


Fig. 8

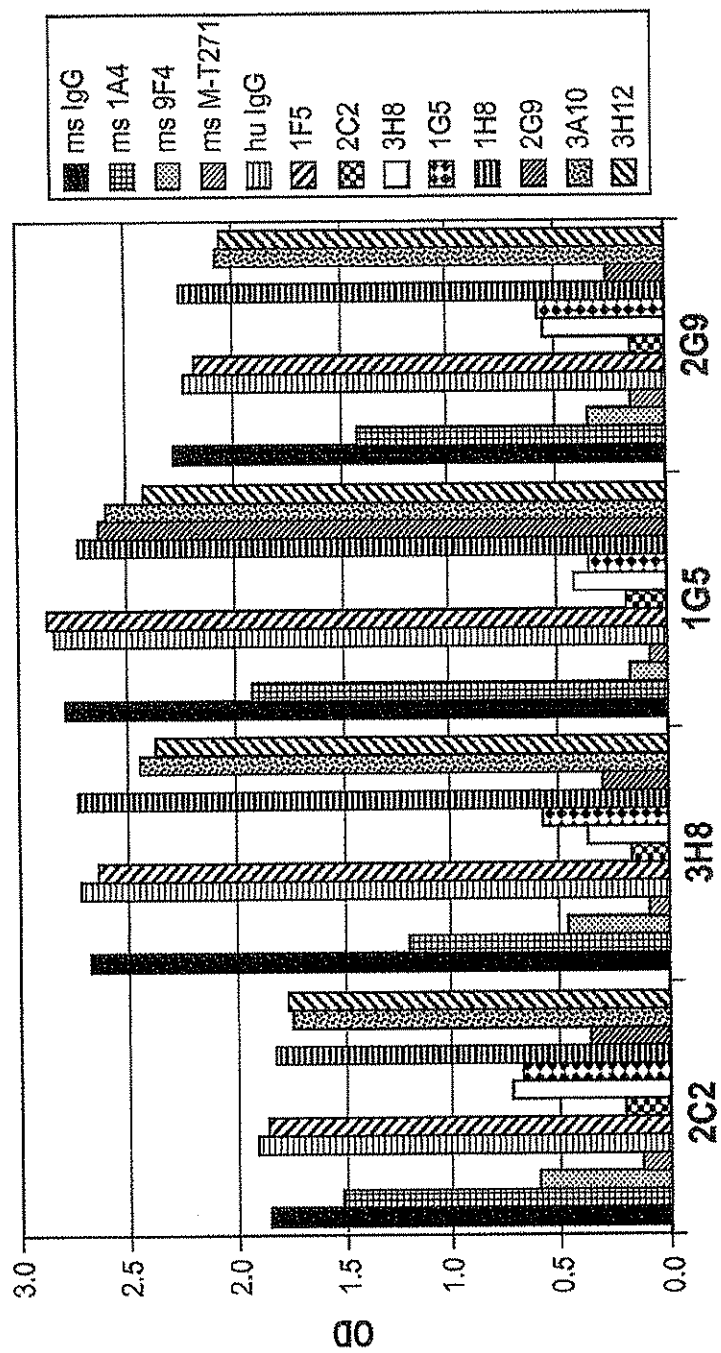
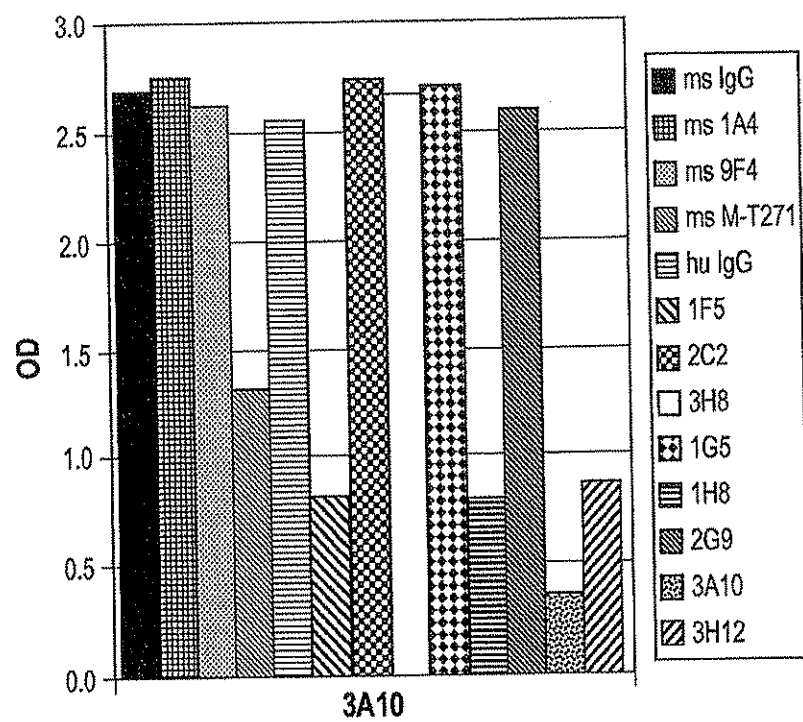
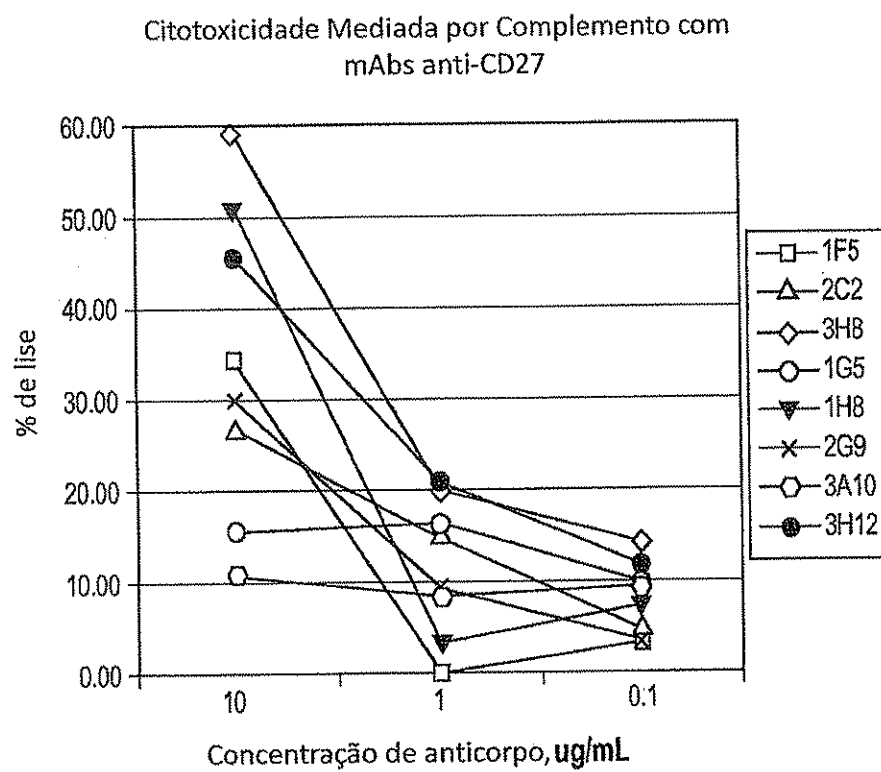


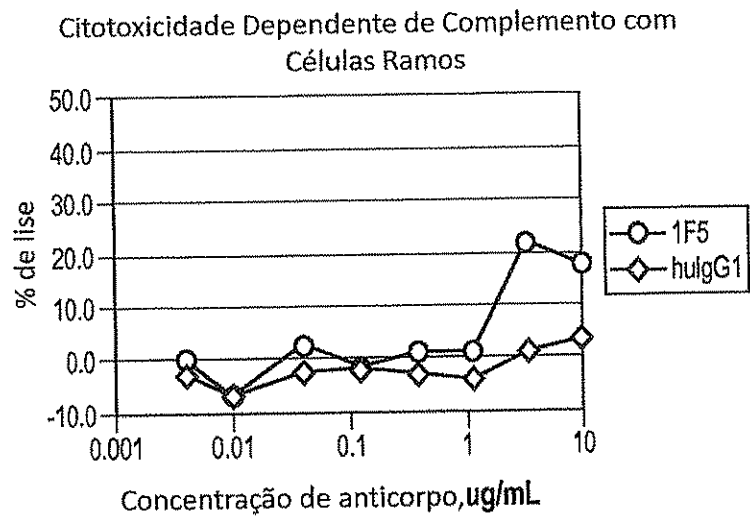
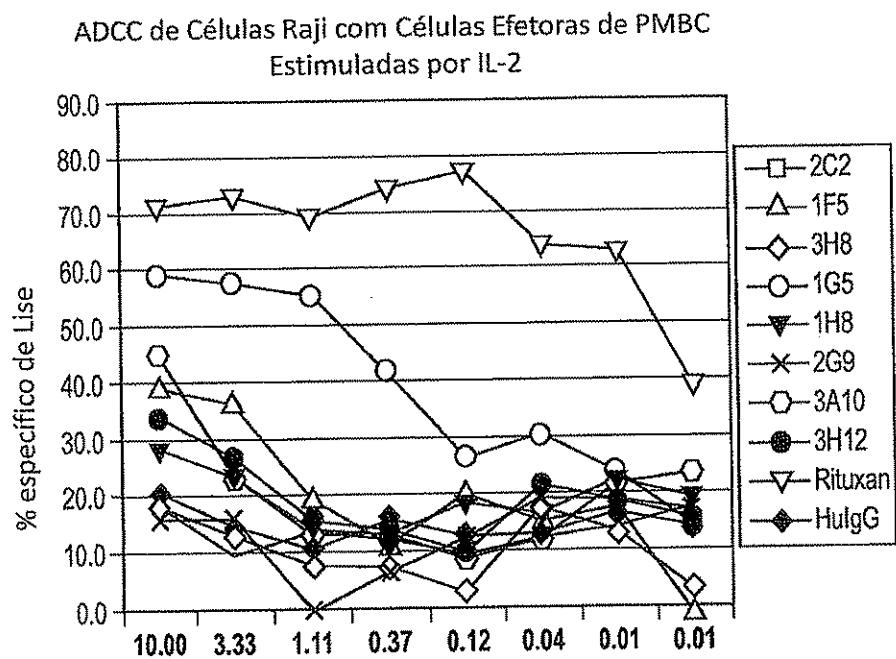
Fig. 9

*Fig. 10*



HuIgG = 0% de Lise

Fig. 11

**Fig. 12****Fig. 13**

ADCC
75:1 E:T

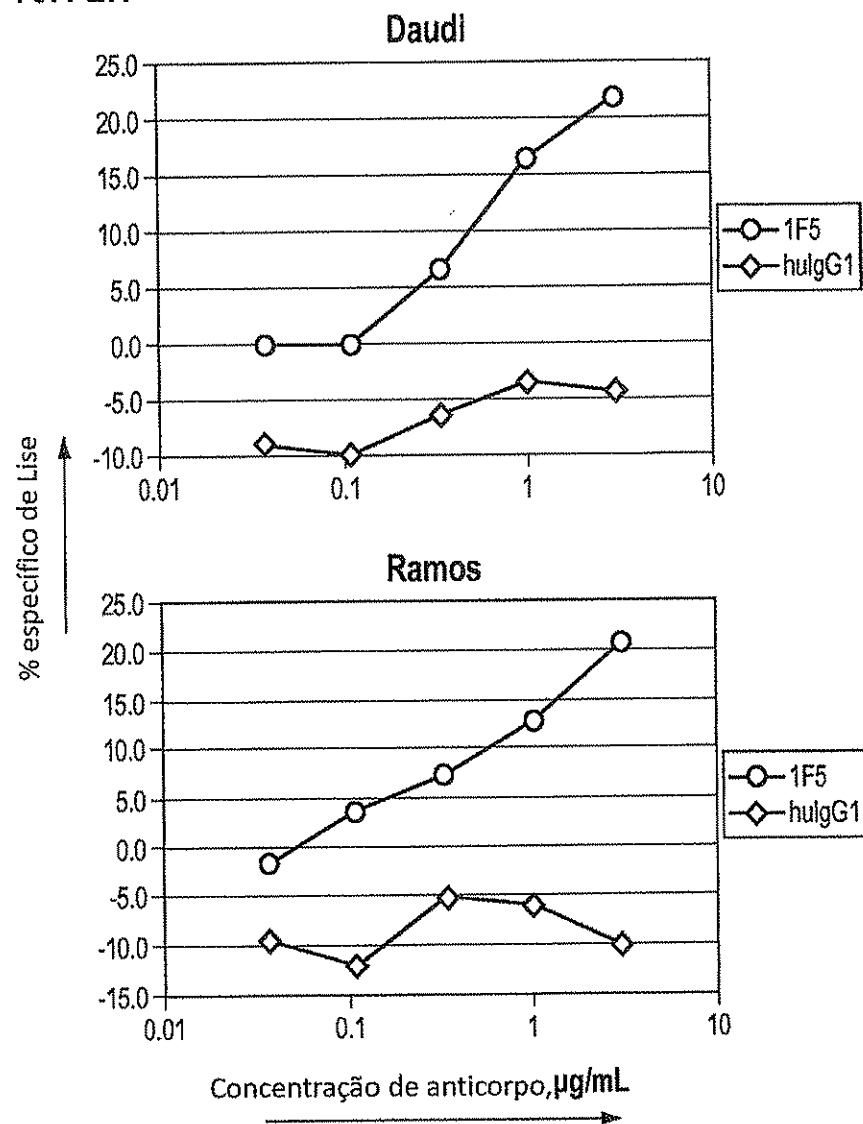


Fig. 14

Alinhamento VHs

		1	50
1F5-1H5 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSS	
1G5-1B9 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFSFSS	
1H8-B4 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFNI	
2C2-1A10 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSS	
2G9-1D11 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTLSS	
3A10-1G10 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSS	
3H12-1E12 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCATSGFTFSS	
3H8-1B11 V-H	(1)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	
		51	100
1F5-1H5 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYL	
1G5-1B9 V-H	(51)	YGMHWVRQAPGKGLEWVALLWYDGSNKHDFADSVKGRFTISRDNKNTLDL	
1H8-B4 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYL	
2C2-1A10 V-H	(51)	YDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDSNKKYADSVKGRFTISRDNSTNSLFL	
2G9-1D11 V-H	(51)	HDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDSNKKYADSVKGRFTISRDNSTNSLFL	
3A10-1G10 V-H	(51)	YGMHWVRQAPGKGPWVAIIWYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLDL	
3H12-1E12 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYL	
3H8-1B11 V-H	(51)	YMAWVRQAPGKLEWLGNKQDCSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYL	
		101	143
1F5-1H5 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCARGSGN-----WGFFDYWGQGLVTVSS	
1G5-1B9 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCAREGLAVPG---HWYFDLWGRGTLVTVSS	
1H8-B4 V-H	(101)	QMNILRAEDTAVYYCARG--TH-----WGYFDYWGQGLVTVSS	
2C2-1A10 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCVGG-----TADLEHWDQGLVTVSS	
2G9-1D11 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCVRG-----TADLEHWDQGLVTVSS	
3A10-1G10 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCARDGWTMVRGLNVFDIWGQGMTVTVSS	
3H12-1E12 V-H	(101)	QMNSLGEDTAVYYCARGSGN-----WGFFDYWGQGLVTVSS	
3H8-1B11 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCVRELG-----MDWYFDLWGRGTLVTVSS	

Fig. 15

Alinhamento VKs

	1	50
1F5-1H5 V-L #2	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
1G5-1B9 V-L	(1) MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
1H8-B4 V-L	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
2C2-1A10 V-L	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
2G9-1D11 V-L	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
3A10-1G10 V-L #2	(1) MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
3H12-1E12 V-L #2	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
3H8-1B11 V-L #2	(1) MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV	
	51	100
1F5-1H5 V-L #2	(51) RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
1G5-1B9 V-L	(51) SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
1H8-B4 V-L	(51) SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASNLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
2C2-1A10 V-L	(51) SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
2G9 1D11 V-L	(51) SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
3A10-1G10 V-L #2	(51) SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
3H12-1E12 V-L #2	(51) RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP	
3H8-1B11 V-L #2	(51) SYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEP	
	101	127
1F5-1H5 V-L #2	(101) EDFATYYCQQYNTYPTFTFGGQTKVEIK	
1G5-1B9 V-L	(101) EDFATYYCQQFNTYPTFTFGGQTKVEIK	
1H8-B4 V-L	(101) EDFATYYCQQYNSYPTFTFGGQTKVEIK	
2C2-1A10 V-L	(101) EDFATYYCQQYNSYPLTFTFGGQTKVEIK	
2G9 1D11 V-L	(101) EDFATYYCQQYNSYPLTFTFGGQTKVEIK	
3A10-1G10 V-L #2	(101) EDFATYYCQQFNSYPTFTFGPGTKVDIK	
3H12-1E12 V-L #2	(101) EDFATYYCQQYNTYPTFTFGGQTKVEIK	
3H8-1B11 V-L #2	(101) EDFAVYYCQQRSNWPPTFTFGGQTKVEIK	

Fig. 16

1F5 em linfócitos circulantes após uma dose única de 1 mg/kg

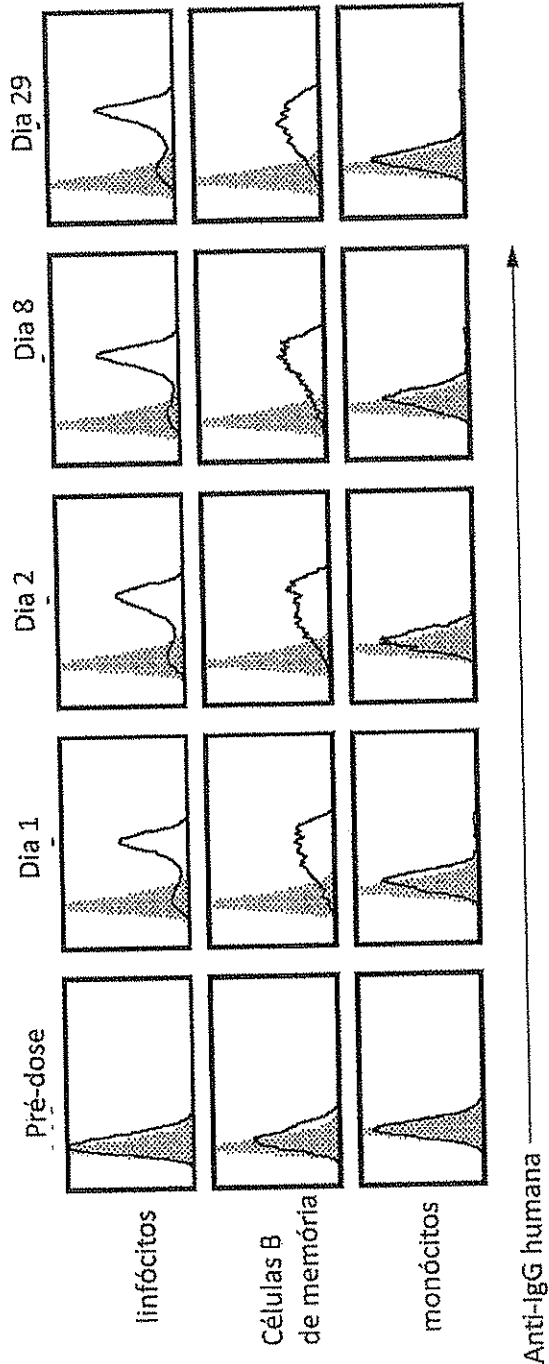


Fig. 17

1F5 não significativamente depleta linfócitos circulantes após uma dose única de 1-10 mg/kg

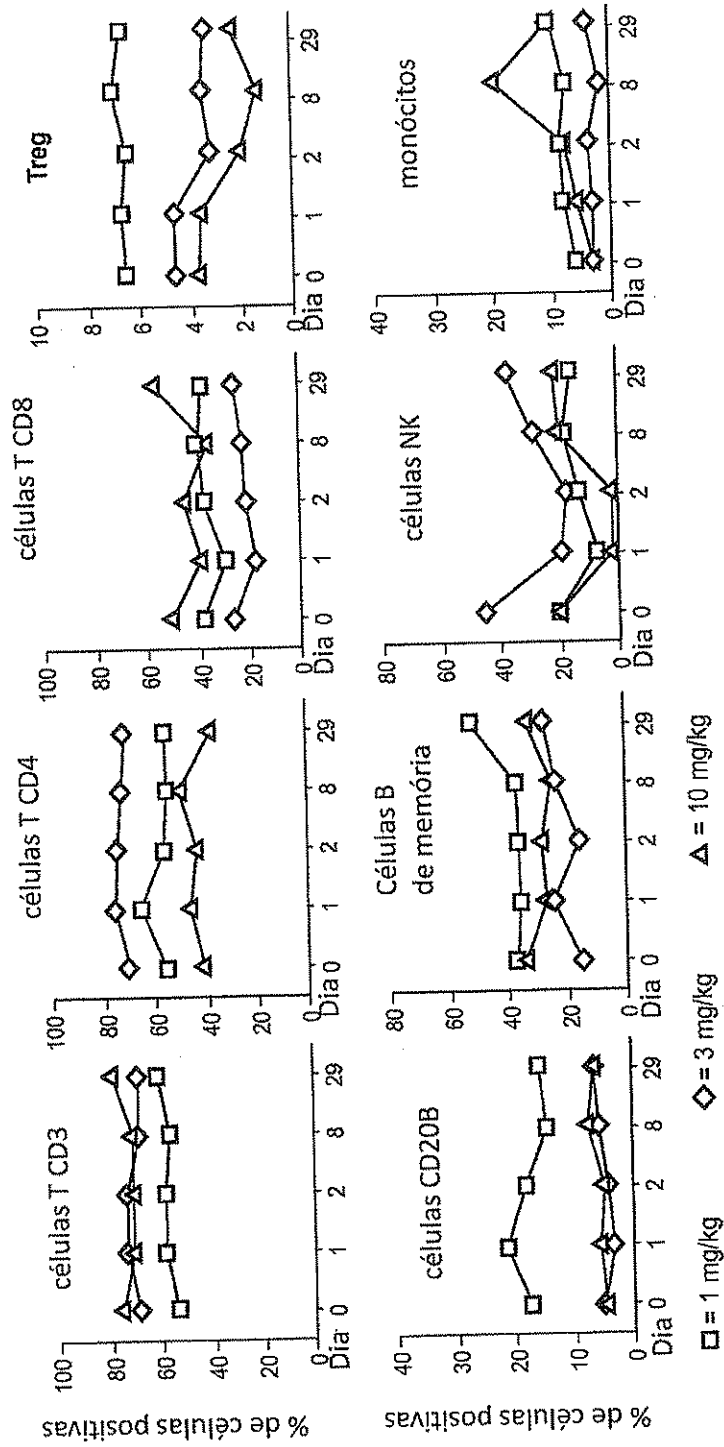
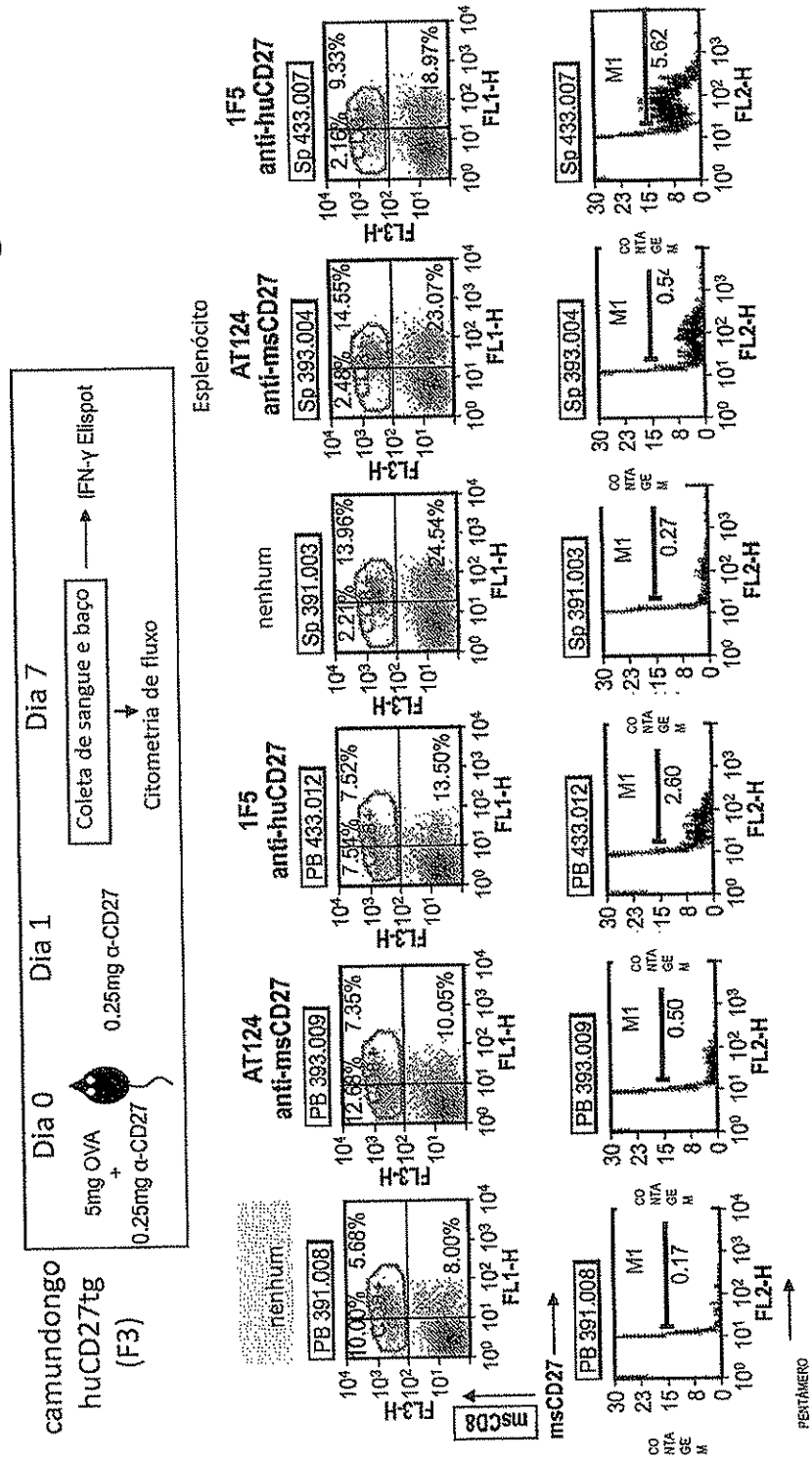


Fig. 18

Manchamento de Pentâmero H-2K^b/intensificado
com Anticorpos Anti-CD27

Fig. 19



Células T que produzem mais IFN- γ
com anticorpos anti-CD27

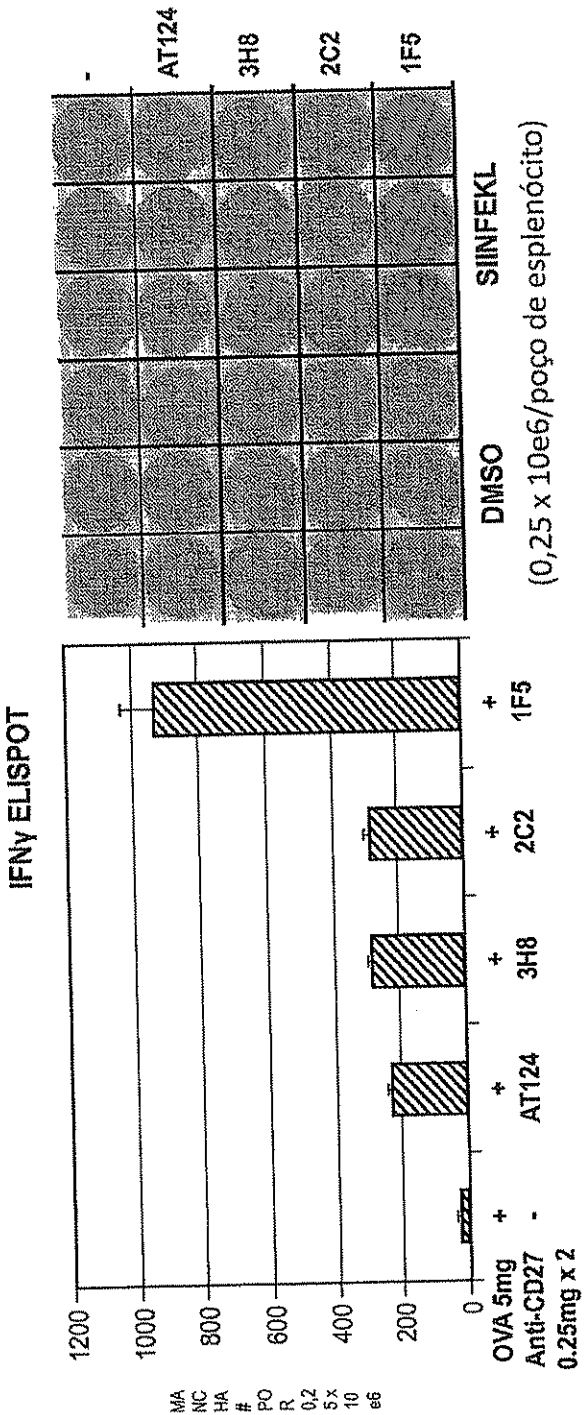


Fig. 20

Figura 21
HuMAbs CD27 intensifica a resposta de célula T CD8+
específica de antígeno para vacina

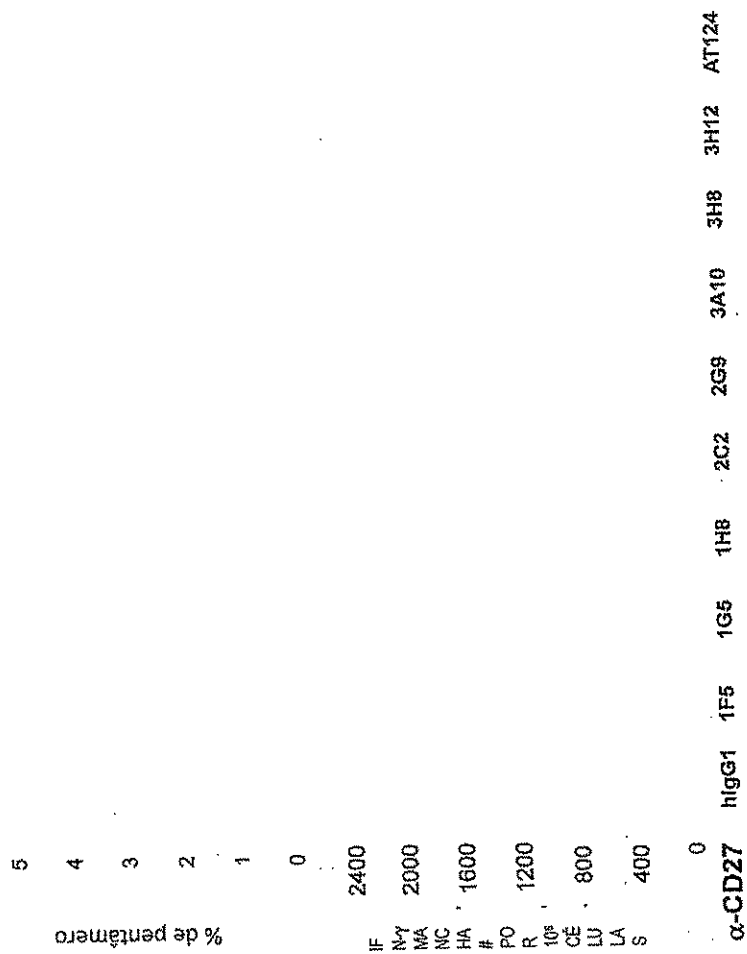
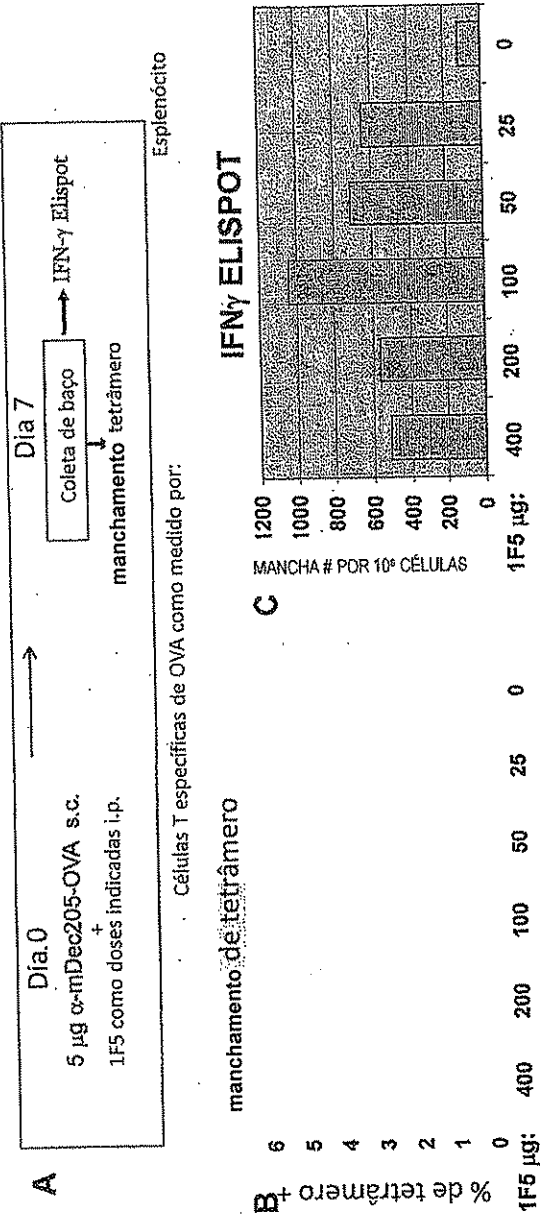


Figura 22



A Efeito sinérgico de um α -CD27 e ^{POLYIC em} resposta de célula T à vacina (α -DEC205-OVA)

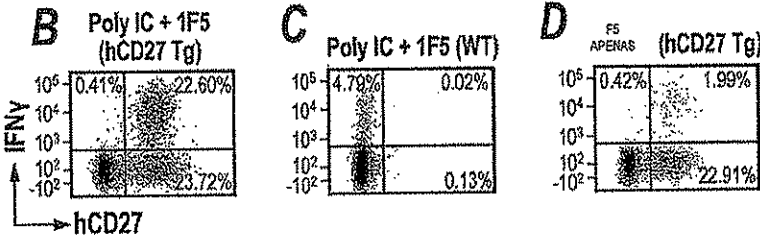
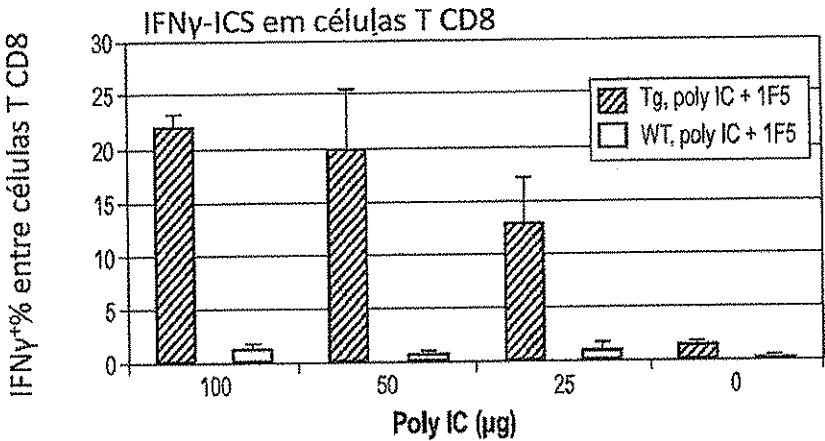


Fig. 23

Tempo de Administração de α -CD27 com vacina em ativação de célula T
dosagem 1F5 em relação à vacina:

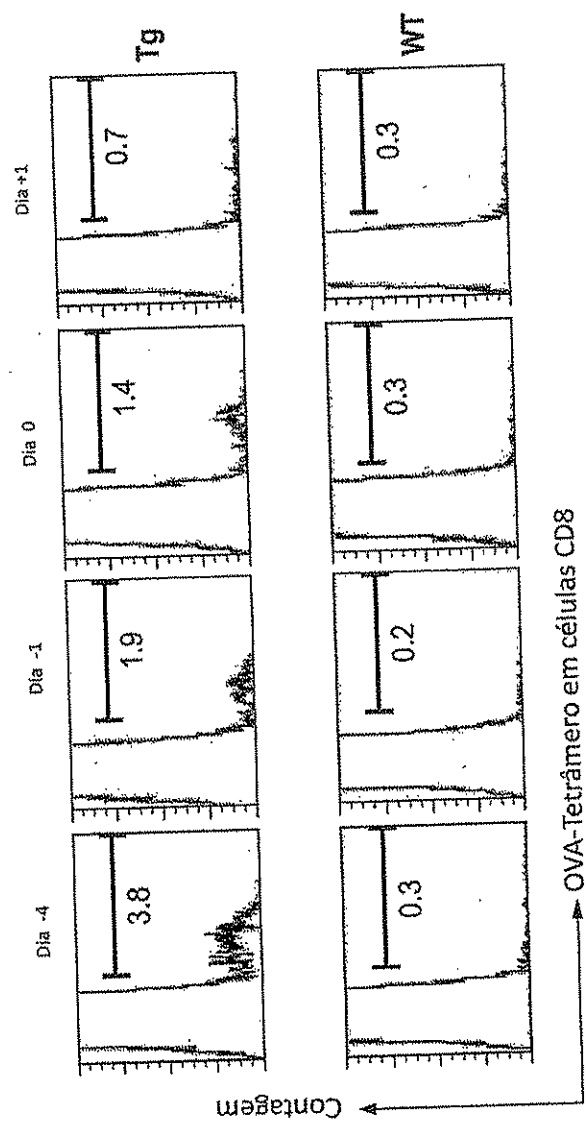


Fig. 24

Tempo de Administração de α -CD27 com vacina em ativação de célula T
(em combinação com Poli IC)

dosagem 1F5 em relação à vacina:

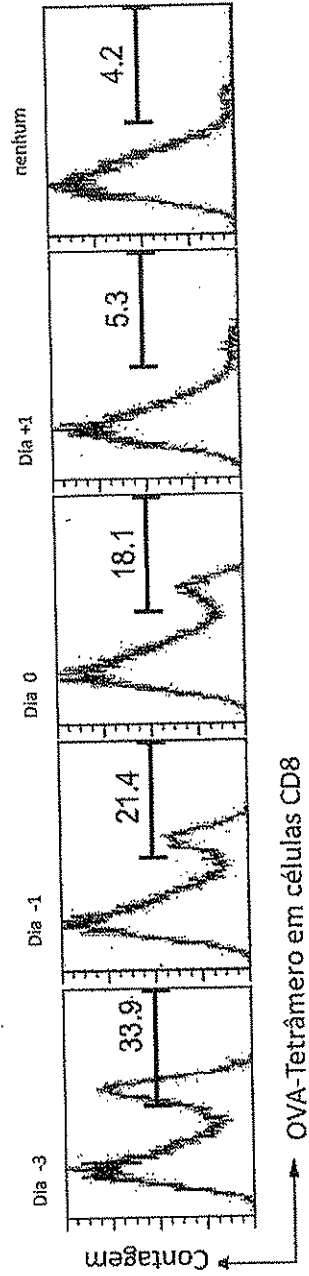


Fig. 25

1F5 combinado com Ativação de TCR induz proliferação e produção de citocina de células T in vitro

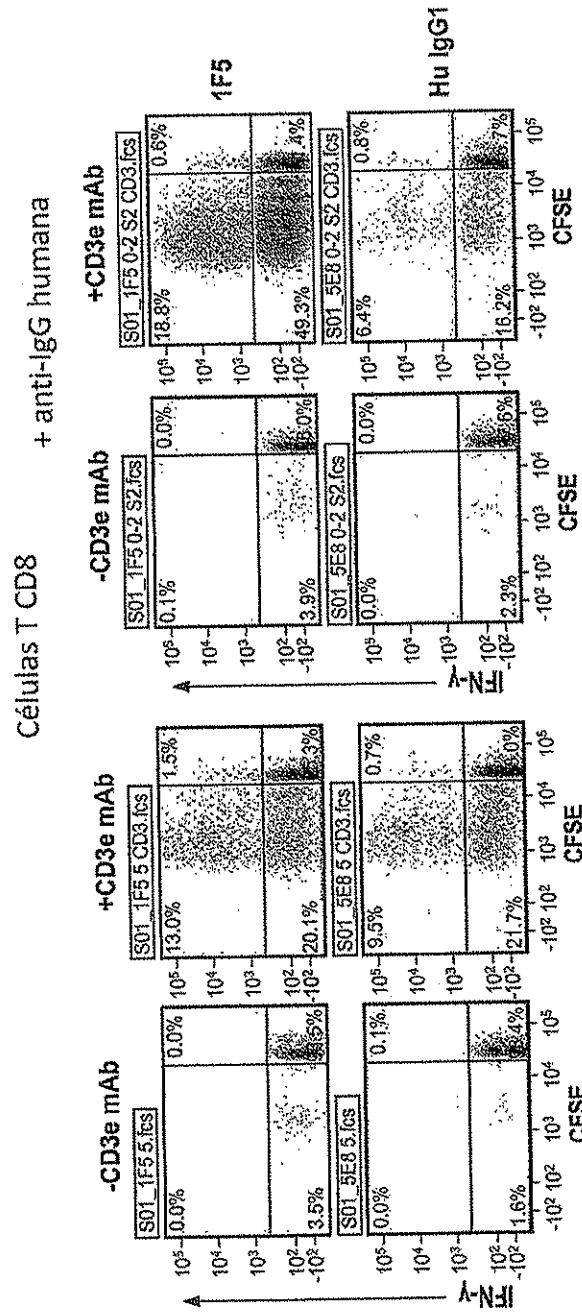


Fig. 26

1F5 combinado com Ativação de TCR induz proliferação e produção de citocina de células T in vitro

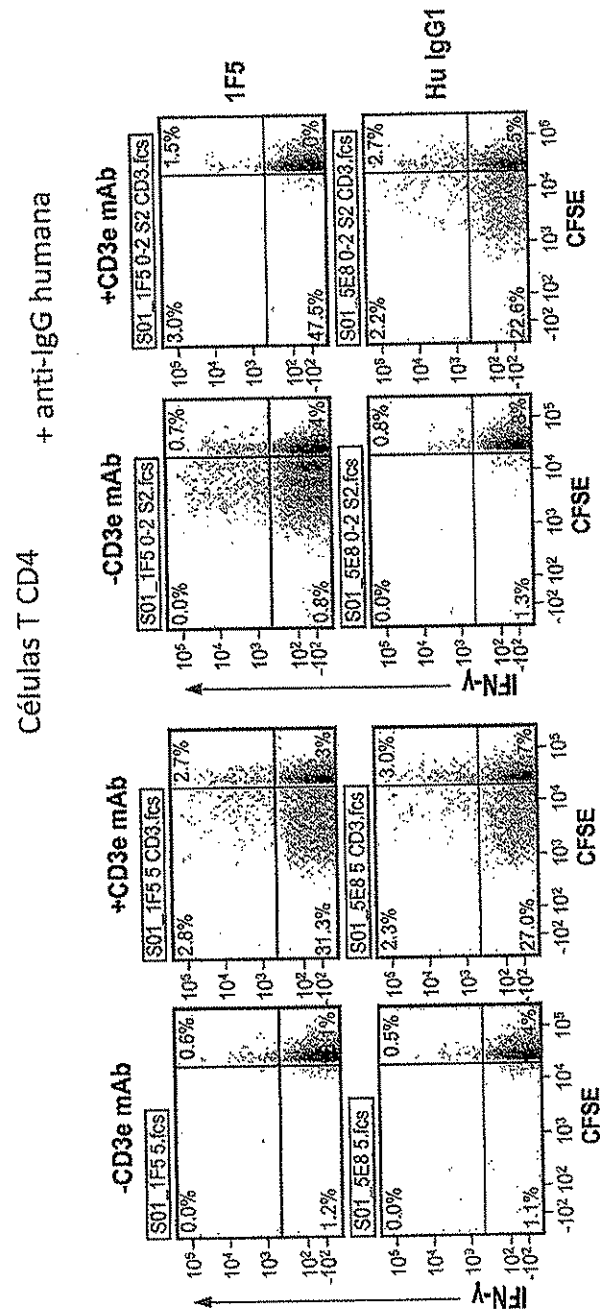


Fig. 27

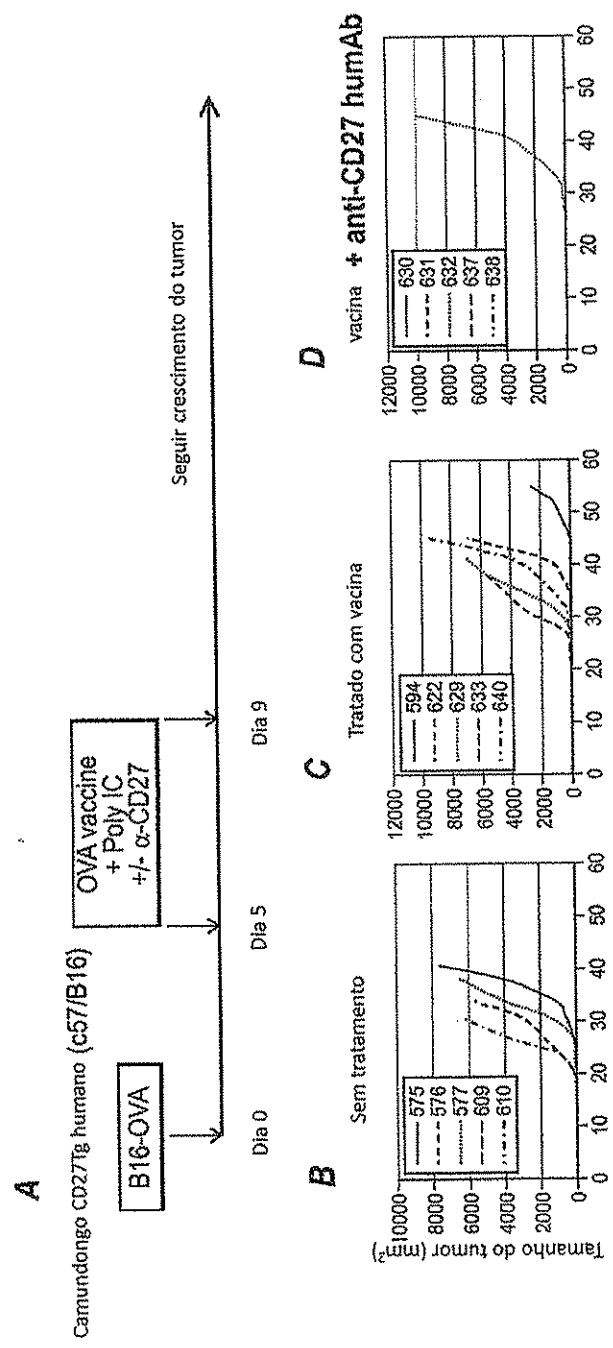


Fig. 28

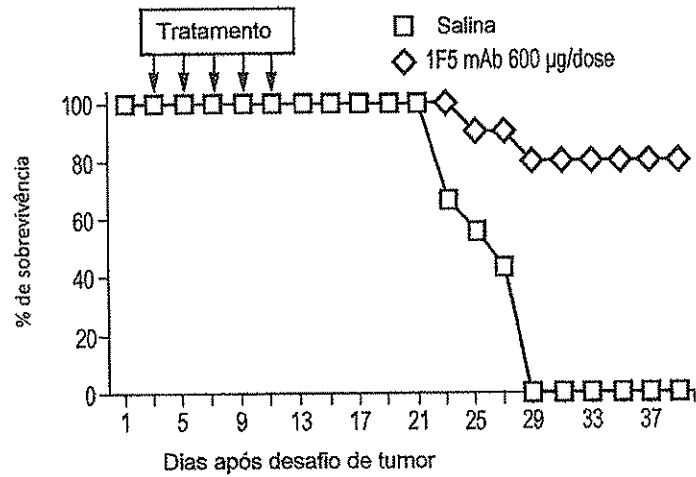
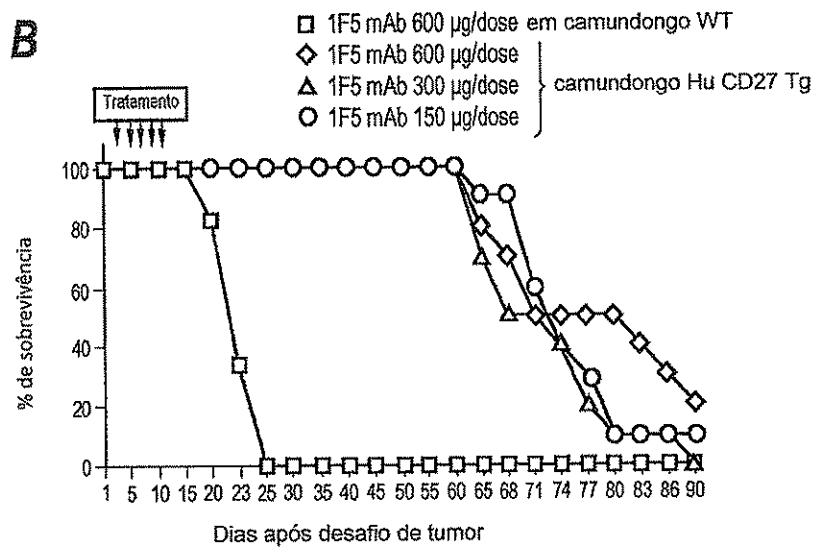
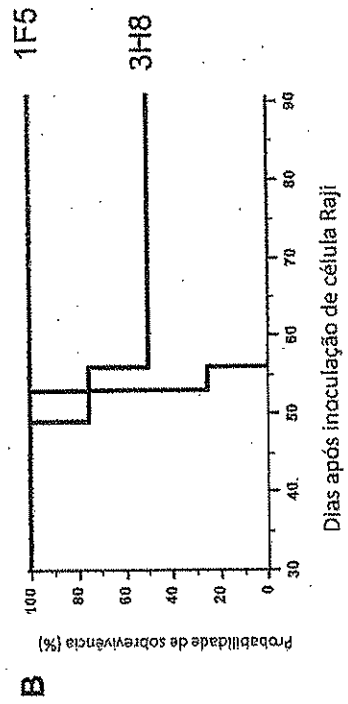
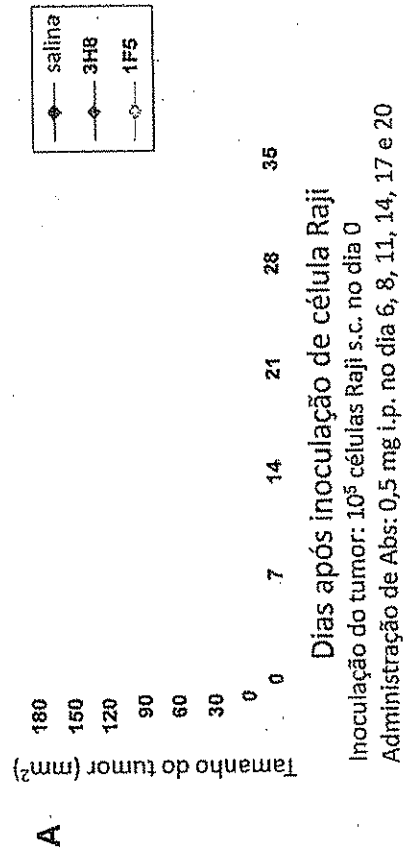
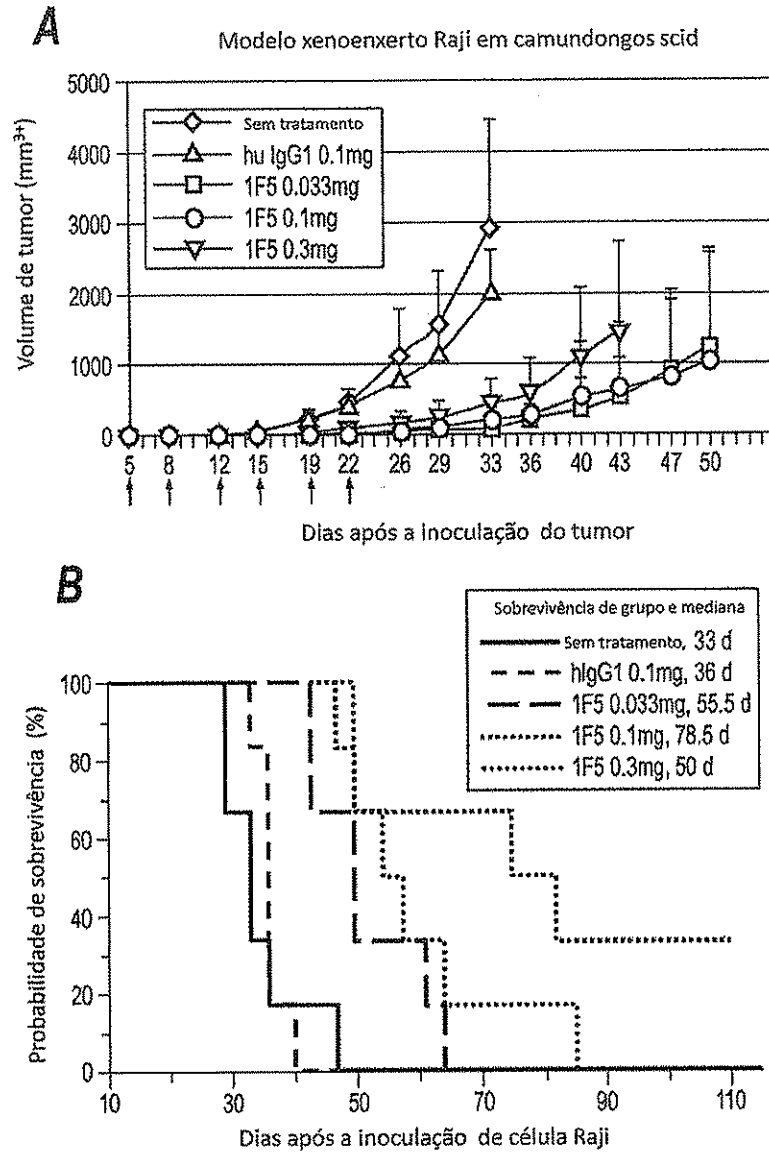
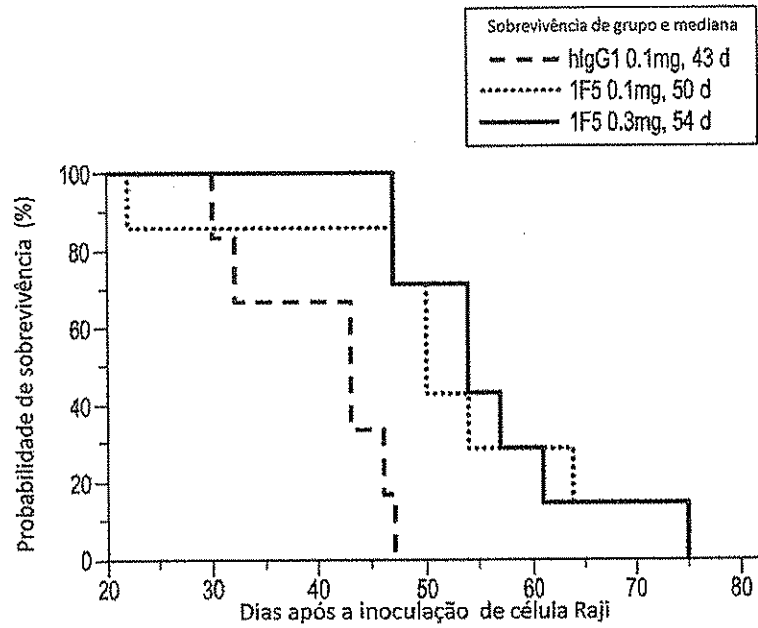
Eficácia de 1F5 em Modelo de Tumor Síngeneico BCL₁**A****B****Fig. 29**

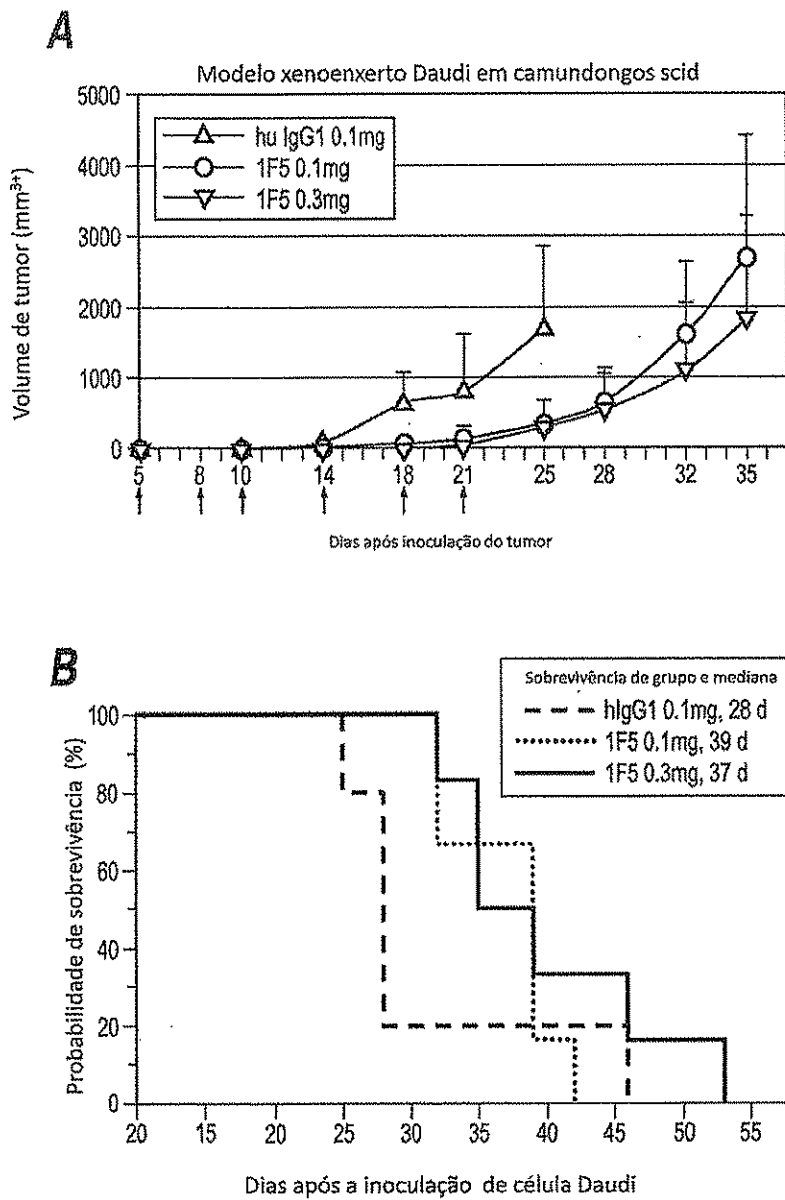
Figura 30

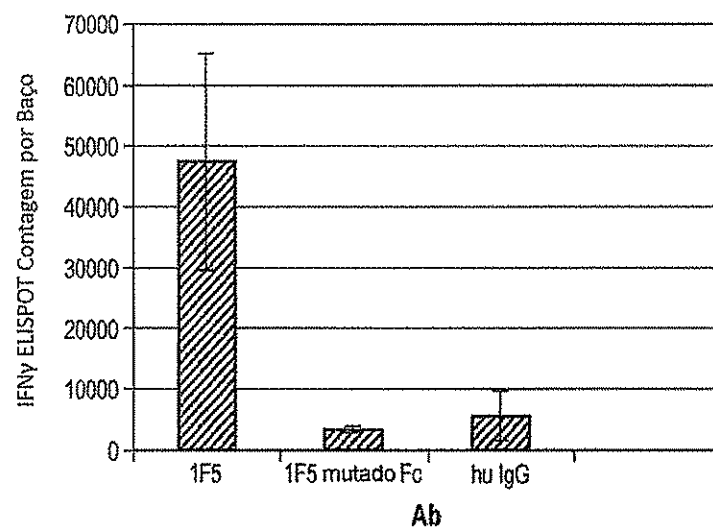
Modelo xenoenxerto Raji em camundongos scid



**Fig. 31**

**Fig. 32**

**Fig. 33**

**Fig. 34**

RESUMO

“ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO OU HUMANIZADO, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, COMPOSIÇÃO, E, USOS DE UM ANTICORPO.”

- 5 Anticorpos monoclonais isolados que se ligam ao CD27 humana e composições e moléculas com base em anticorpo relacionadas são descritos. Ainda são descritos métodos terapêuticos e de diagnósticos para usar os anticorpos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



72DBBABF9414492D

Campo 2



9ABE17AA9784CCEE

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 117267e001.txt
- Data de Geração do Código: 18-12-2012
- Hora de Geração do Código: 09:27:29
- Código de Controle:
 - Campo 1: 72DBBABF9414492D
 - Campo 2: 9ABE17AA9784CCEE

“ANTICORPO MONOCLONAL, MOLÉCULA BIESPECÍFICA, ANTICORPO ISOLADO, VETOR DE EXPRESSÃO, CÉLULA TRANSFORMADA, COMPOSIÇÃO, E, MÉTODOS PARA INDUZIR OU INTENSIFICAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UM ANTÍGENO, PARA INIBIR O CRESCIMENTO DE CÉLULAS, QUE INIBE A LIGAÇÃO DE CD70 A CD27 EM CÉLULAS, DE REGULAGEM NEGATIVA DE UMA RESPOSTA DE CÉLULA, PARA DETECTAR A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE CD27 EM UMA AMOSTRA BIOLÓGICA, E PARA INTENSIFICAR UMA RESPOSTA IMUNE CONTRA UM ANTÍGENO”

Fundamento da invenção

Interações entre as células T e células apresentadoras de antígeno envolvem uma variedade de moléculas acessórias que facilitam a geração de uma resposta imune. Uma dita molécula é CD27, que liga CD70 e pertence à superfamília de receptores (TNF-R) de fator de necrose tumoral (Ranheim EA, et al., *Blood*. 15 de Junho de 1995; 85(12):3556-65). CD27 normalmente existe como uma proteína transmembrana tipo I glicosilada, frequentemente sob a forma de homodímeros com uma ponte dissulfeto, ligando os dois monômeros. A ponte dissulfeto é do domínio extracelular perto da membrana (Camerini et al., *J Immunol*. 147:3165-69 (1991). CD27 pode ainda ser expressa em uma forma solúvel (ver, por exemplo, van Oers MH, et al., *Blood*. 1993 Dez.1; 82(11): 3430-6 and Loenen WA, et al., *Eur. J. Immunol*. 22:447, 1992). A ligação cruzada de antígeno CD27 a células T fornece um sinal de coestimulação que, em conjunto com ligação cruzada de receptor de células T, pode induzir a proliferação celular e a ativação imune

A **Figura 14** é um gráfico que descreve os resultados de outra citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo (ADCC) usando mAb 1F5.

5 A **Figura 15** é um alinhamento de sequências VH de anticorpos anti-CD27 humanos (1F5 (SEQ ID NO: 36), 1G5 (SEQ ID NO: 60), 1H8 (SEQ ID NO: 48), 2C2 (SEQ ID NO: 24), 2G9 (SEQ ID NO: 72), 3A10 (SEQ ID NO: 84), 3H12 (SEQ ID NO: 102) e 3H8 (SEQ ID NO: 6)).

10 A **Figura 16** é um alinhamento das sequências VL de anticorpos anti-CD27 humanos (1F5 (SEQ ID NO: 42), 1G5 (SEQ ID NO: 66), 1H8 (SEQ ID NO: 54), 2C2 (SEQ ID NO: 78), 2G9 (SEQ ID NO: 30), 3A10 (SEQ ID NO: 120), 3H12 (SEQ ID NO: 108) e 3H8 (SEQ ID NO: 12)).

15 As **Figuras 17 e 18** mostram os resultados de um estudo in vivo em primata não humano usando mAb 1F5. Em particular, a Figura 17 mostra 1F5 em linfócitos circulantes após uma dose única. A Figura 18 mostra 1F5 não significativamente esgotado em linfócitos circulantes.

A **Figura 19** descreve o resultado de um ensaio de manchamento de pentâmero em células de sangue periféricas de camundongo e esplenócitos.

A **Figura 20** descreve os resultados de um ensaio ELISPOT e produção aumentada de IFN γ usando anticorpos anti-CD27.

20 A **Figura 21** mostra melhora por anti-CD27 mAbs de respostas de células T a um antígeno de vacina em um modelo de camundongo transgênico por manchamento de pentâmero e IFN ELISPOT.

25 As **Figuras 22A-C** são o protocolo para e resultados de um experimento que mostra que anti-CD27 melhora as respostas de célula T a uma vacina direcionada a APC (α -DEC205-OVA). A Figura 22A mostra o protocolo para o experimento. A Figura 22B mostra os resultados de um experimento de manchamento de tetrâmero para medir células T específicas de antígeno. A Figura 22C mostra os resultados de um ensaio IFN-gama ELISPOT para medir as células T específicas de antígeno.

As Figuras 23A-D são os resultados de um experimento que mostra que anti-CD27 em combinação com o agonista TLR3 PolyIC (a 25 µg, 50 µg ou 100 µg) melhora as respostas de célula T a uma vacina direcionada a APC (α -DEC205-OVA). A Figura 23A é um gráfico que mostra o % de células positivas para IFN-gama entre células T CD8+ T para camundongos tipo selvagem tratados com poly IC e o anti-CD27 mAb 1F5, camundongo transgênico huCD27 com poly IC e um anticorpo IgG1 humano controle ou camundongo transgênico huCD27 tratado com poli IC e o anti-CD27 mAb 1F5.

As Figuras 24 e 25 mostram resultados de um estudo de administração de um anti-CD27 mAb antes da vacina na presença ou ausência de T: LR agonista e mostram a significância de tempo de administração do anticorpo em relação à vacina.

As Figuras 26 e 27 mostram resultados de administração de anti-CD27 mAb em combinação com ativação de TCR em células T de camundongos transgênicos de CD27 humanos, como mostrado por ambos proliferação e produção de citocina.

As Figuras 28A-D são o protocolo para e resultados de um experimento que mostra que anti-CD27 melhora a eficácia de uma vacina α -DEC205-OVA em um modelo de desafio de melanoma MO4 (B16-OVA). A Figura 24A mostra o protocolo para o experimento. A Figura 24B é um gráfico plotando o tamanho do tumor (em mm²) contra número de dias após a inoculação de tumor em camundongos não tratados. A Figura 24C é um gráfico plotando o tamanho do tumor (em mm²) contra o número de dias após a inoculação de tumor em camundongos tratados com a vacina isolada. A Figura 24D é um gráfico plotando o tamanho do tumor (em mm²) contra o número de dias após a inoculação de tumor em camundongos tratados com a vacina em combinação com um anticorpo anti-CD27.

As Figuras 29A e B são gráficos que mostram sobrevida prolongada de camundongos transgênicos com CD27 humanos (modelos de

e IgG1 humana irrelevante foram incluídos como controles positivos e negativos, respectivamente. Cada anticorpo (250 µg) foi coinjetado com ovalbumina no dia 0 e 250µg adicionais de anticorpo sozinho no dia 1. Células periféricas do sangue e de baço foram colhidas no dia 7. Esplenócitos (1×10^6) ou sangue total (100 l) foram utilizados para o mancha-
 5 do receptor Fc, as células foram coradas com 10 µl de H-2Kb/SIINFEKL, um complexo tetramérico de MHC de camundongo complexado com o epítipo de célula T de peptídeo de ovalbumina (Beckman Coulter), ou uma pentamérica complexa semelhante (ProImmune), anti-CD8 (eBioscience) e mAb anti-
 10 huCD27 ou mAb anti-msCD27 (BD Biosciences) em temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram então lisadas por RBC, lavadas e fixadas, e pelo menos 100.000 eventos foram adquiridos em Flow Cytometer LSR (BD Biosciences). A fração de células positivas para tetrâmero ou pentâmero na população CD8⁺ ou CD27⁺ foi determinada. Os resultados são mostrados nas
 15 Figuras 19 e 21 a partir do qual pode ser observado que anticorpos anti-CD27 significativamente melhoraram as respostas imunes.

Exemplo 12

Ensaio ELISPOT

Esplenócitos ($2,5 \times 10^5$ e $0,5 \times 10^5$) a partir da preparação de
 20 mancha-mento de pentâmero de Exemplo 8 acima foram colocados em placas revestidas com anticorpo monoclonal anti-IFN γ (mAb) em poços em triplicata após lise RBC. Peptídeo SIINFEKL (SEQ ID NO: 119) foi adicionado a uma concentração final de 2µg/ml. Um controle de background foi ajustado para cada amostra em triplicata na ausência de
 25 peptídeo. O estímulo foi mantido durante a noite a 37° C em uma incubadora de cultura de tecidos. A detecção de ELISPOT foi executada usando um kit ELISPOT (BD Biosciences) seguindo o protocolo do fabricante. Número de IFN γ -spot foi contado. Os resultados são mostrados nas Figuras 20 e 21, a partir do qual pode ser observado que mAbs anti-CD27

significativamente melhoraram a atividade de células T.

Exemplo 13

mAb Anti-CD27 melhora respostas de célula T a um antígeno de vacina

Camundongos transgênicos HuCD27 foram imunizados com 5
 5 µg (s.c.) da vacina direcionada para APC compreendendo um anticorpo IgG
 anti-DEC-205 de camundongo fundido a ovalbumina (OVA) (referenciada
 como α-mDEC-205-OVA), em combinação com o mAb 1F5 anti-CD27
 humano (i.p.) em diferentes doses (25, 50, 100, 200 ou 400 g). Uma semana
 mais tarde esplenócitos foram analisados para a reatividade de células T CD8+
 10 para o peptídeo SIINFEKL OVA (SEQ ID NO: 119) (OVA peptídeo 257-264)
 por manchamento de tetrâmero (% de tetrâmero positivo de todos os CD8+
 mostrado) e IFN- γ ELISPOT pelo procedimento descrito geralmente como
 exemplos 8 e 9, respectivamente. Os resultados são mostrados nas figuras 22A-
 C, onde a Figura 22A mostra o protocolo usado, Figura 22B mostra os
 15 resultados de experimento de manchamento tetrâmero e Figura 22 C mostra os
 resultados do experimento de IFN-gama ELISPOT. Estes resultados indicam
 que o mAb 1F5 humano coadministrado melhorou significativamente as
 respostas de células T para o componente da vacina administrada.

Exemplo 14

20 Efeito sinérgico de mAb anti-CD27 (1F5) e agonista TLR (poli IC) em Respostas de célula T a vacina (anti-DEC205-OVA)

Camundongos Tg-huCD27 (transgênicos) e tipos selvagens
 (WT) littermates foram injetados intraperitonealmente com mAb 1F5 anti-
 CD27 (50 g) no dia -3 e, em seguida, por via subcutânea através de 4 patas
 25 injetadas com anti-mDec205-OVA (g 5) mais poli IC 0, 25, 50 ou 100 µg no
 dia 0. Baços foram coletados no dia 7 e avaliados por manchamento de
 tetrâmero, IFN γ ELISPOT e IFN γ -ICS. Média $\pm$ SD de IFN-ICS positivas
 entre células T CD8 de 3 camundongos por grupo foram calculados e um
 painel Dot Plots representativos foi coletado. Os resultados, mostrados na

Camundongos transgênicos HuCD27 foram imunizados com 5 µg (s.c.) da vacina direcionada para APC compreendendo um anticorpo IgG anti-DEC-205 de camundongo fundido a ovalbumina (OVA) (referenciada como α -mDEC-205-OVA), em combinação com o mAb 1F5 anti-CD27 humano (i.p.) ou mAb 1F5 mutante (porção Fc mutada para impedir a ligação ao receptor Fc) ou mAb IgG controle. Uma semana mais tarde os esplenócitos foram analisados para a reatividade de células T CD8+ para o peptídeo OVA SIINFEKL (SEQ ID NO: 119) (peptídeo OVA 257-264) por IFN- γ ELISPOT pelo procedimento como descrito geralmente.

Os resultados, mostrados na Figura 34, demonstram que o mAb 1F5 humano alterado não melhoram as respostas de células T para a vacina e assim seria um agente efetivo para bloquear a via CD70/CD27.

Equivalentes

Os especialistas na técnica reconhecerão, ou estão aptos a verificar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das modalidades específicas da invenção descrita aqui. Ditos equivalentes se destinam a estar incluídos pelas seguintes reivindicações.