REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0418029-1

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0418029-1

(22) Data do Depósito: 09/12/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 14/07/2005

(51) Classificação Internacional: A61K 39/395; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: US 60/531,639 de 22/12/2003.

(54) Título: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA LÍQUIDA, ESTÁVEL, ADEQUADA PARA ADMINISTRAÇÃO PARENTÉRICA QUE COMPREENDE UM ANTICORPO AGONISTA DE CD40

(73) Titular: PFIZER PRODUCTS INC., Sociedade Norte-Americana. Endereço: Eastern Point Road, Groton, CT 06340, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: VAHE BEDIAN; JOHN DANIEL CUSMANO; RONALD PAUL GLADUE.

Código de Controle: D4C268F50A8DAA69 DD515FCA3FB97D05

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 26/12/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 26/12/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA LÍQUIDA, ESTÁVEL, ADEQUADA PARA ADMINISTRAÇÃO PARENTÉRICA QUE COMPREENDE UM ANTICORPO AGONISTA DE CD40".**

Antecedentes da Invenção

CD40 é um membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR). É expresso em células apresentadoras de antígeno (células B, células dendríticas, monócitos), precursores hematopoiéticos, células endoteliais, células do músculo liso, células epiteliais, assim como na maioria dos tumores humanos. (Grewal & Flavell, Ann. Rev. Immunol., 1996, 16: 111-35; Toes & Schoenberger, Seminars im Immunology, 1998, 10(6): 443-8). Estudos que usam agentes agonistas de CD40 descreveram que a estimulação do receptor CD40 induz uma cascata de efeitos associados ``a atividade antitumoral. Por exemplo, demonstrou-se que a estimulação do receptor CD40 nas células apresentadoras de antígeno aumenta a sua maturação, função apresentadora de antígeno, potencial coestimulador e a liberação de citocinas imunorreguladoras (Lee et al., PNAS USA, 1999, 96(4): 1421-6; Cella et al., J. Exp. Med., 1996, 184(2):747-52). Também foram descritos agonistas de CD40 que promovem a apoptose de tumores CD40+ e aumentam a sua capacidade para serem processados pelas células dendríticas (von Leoprechting et al., Cancer Res., 1999, 59:1287-94; Sotomayo et al., Nature Medicine, 1999, 5(7):780-87; Eliopoulos et al., Mol. Cell Biol., 2000, 29(15):5503-15; Ziebold et al., Arch. Immunol. Therapiae Experimentalis, 2000, 48(4): 225-33; Hoffmann et al., J. Immunol., 2001, 24(2):162-71). A importância destes efeitos imunoestimuladores e antitumorais diretos foi demonstrada em modelos animais onde se mostrou que anticorpos agonistas de CD40 evitam o crescimento de tumores e invertem a tolerância de tumores (Diehl et al., Nature Med., 1999, 5(7): 774-9; Franscisco et al., Cancer Res., 2000, 60(12): 32225-31). Anticorpos CD40 são referidos nas publicações de patentes que se seguem: U.S. 5 786 456; U.S. 5 674 492; WO 02/088186; US 2003059427; US 20020142358; WO 01/56603; U.S. 5 801 227; EP 806963; WO 88/06891; e WO 94/04570. No entanto, métodos altamente eficazes de administração e formulações de anticorpos CD40 não foram descritos. Também será útil uma formulação estável adequada para

usar em tal tratamento.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a um método de tratamento de câncer, em um paciente necessitado de tal tratamento, compreendendo a administração ao referido paciente de um anticorpo agonista de CD40, ou um seu fragmento, em que o referido anticorpo é administrado de acordo com um regime de dosagem intermitente de pelo menos dois ciclos, cada um dos ciclos compreendendo (a) um período de dosagem durante o qual uma quantidade terapeuticamente eficaz do referido agonista de CD40 é administrado ao referido paciente e, depois, (b) um período de repouso. Em uma modalidade, a administração produz uma concentração plasmática do anticorpo de 0,01 μg/mL a 10 μg/mL, durante pelo menos três horas, e o período de repouso é de pelo menos 1 semana. Em outras modalidades, o período de dosagem é de pelo menos um dia, 1-5 dias ou 1-3 dias. Em outras modalidades, o período de repouso é de 1-8, 1-6 semanas, 2-5 semanas ou 3-4 semanas.

Em determinadas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo agonista de CD40 produz uma concentração plasmática do referido anticorpo entre cerca de 0,03 μg/mL e 10 μg/mL, cerca de 0,03 μg/mL e 1 μg/mL, cerca de 0,03 μg/mL e 0,3 μg/mL, ou cerca de 0,1 μg/mL e 0,3 μg/mL, durante 3 a 120 horas. Em algumas modalidades, a concentração plasmática especificada é mantida durante pelo menos um dia, 24 a 30 horas, 24 a 36 horas, 24 a 48 horas, 24 a 72 horas, 24 a 96 horas, ou 24 a 120 horas. Em algumas modalidades, a concentração plasmática é mantida durante 3 a 96 ou 12 a 72 horas.

Em determinadas modalidades, a quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo agonista de CD40 administrada durante o período de dosagem é cerca de 0,03 a 3,0 mg/kg/dia, 0,1 a 3,0 mg/kg/dia, 0,1 a 1,0 mg/kg/dia ou cerca de 0,1 a 0,3 mg/kg/dia. Em uma modalidade, a dosagem é administrada durante 1-5 dias ou 1-3 dias, consecutivamente ou em dias alternados.

O regime de dosagem intermitente dos anticorpos agonistas de

CD40, como descrito atrás em associação com o tratamento de tumores, é também útil na potenciação de respostas imunes em pacientes e tal utilização é, portanto, proporcionada pela presente invenção. Em determinadas modalidades, o aumento da resposta imune de um paciente resulta em um aumento da expressão de CD23 ou de MHC-II em células B no sangue total do paciente que, por exemplo, pode ser medido no final do período de dosagem.

Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é administrado a um paciente que sofre de imunodeficiências primária e/ou combinada, incluindo imunodeficiência dependente de CD40 com síndrome Hiper-IgM, Imunodeficiência Variável Comum, Agamaglobulinemia de Bruton, deficiências na subclasse de IgG e SCID associada a X (mutações comuns na cadeia gama). Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é administrado para tratar um paciente que está imunossuprimido, por exemplo devido à quimioterapia, ou possui uma doença imunodebilitante, incluindo qualquer doença de imunodeficiência adquirida, como seja HIV. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é administrado para aumentar a imunidade de um paciente mais idoso. Em algumas modalidades, o anticorpo anti-CD40 é administrado para tratar um paciente que possui uma infecção bacteriana, viral, fúngica ou parasítica. Em algumas modalidades, um anticorpo humano agonista anti-CD40 pode ser administrado profilaticamente a um paciente que, devido à idade, doença ou fraco estado de saúde geral, seja suscetível à infecção para evitar ou reduzir o número ou gravidade de infecções.

A presente invenção também proporciona um método de tratamento de um tumor em um paciente compreendendo a administração de um anticorpo agonista de CD40 e de um inibidor da replicação de DNA, de preferência um derivado de platina, especialmente cisplatina. Em algumas modalidades, administra-se cisplatina intravenosamente. Em algumas modalidades, cisplatina é administrada em uma quantidade entre cerca de 25 e 300 mg por m^2, cerca de 50 a 150 mg por m^2, ou cerca de 75 a 100 mg por m^2 de área de superfície do corpo do paciente. Em uma modalidade, a cisplatina é administrada em uma única dose (*por exemplo*, uma única infusão intrave-

nosa). Em uma outra modalidade, é administrada durante 2-5 dias. Em certas modalidades, a quantidade do anticorpo CD40 a ser administrada em combinação com cisplatina é administrada em uma dosagem de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/kg ou cerca de 0,1 a 1,0 mg/kg, ou cerca de 0,1 a 0,3 mg/kg.

Em um outro aspecto, a administração de cisplatina é combinada com o regime de dosagem intermitente do anticorpo CD40, sendo a cisplatina administrada durante um ou mais dos períodos de dosagem ou nos períodos de descanso.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a um método de tratamento de um tumor, em um paciente necessitado de tal tratamento, através da administração ao paciente de um anticorpo agonista de CD40, ou de um seu fragmento, em uma dosagem inferior a 1 mg/kg/dia, em que a concentração sérica C_{max} no paciente, resultante da administração do anticorpo, é inferior a 50 μg/mL. Em uma modalidade, a dosagem é entre 0,1 e 0,3 mg/kg e a concentração sérica C_{max} do anticorpo no paciente é entre 0,5 e 10 μg/mL.

Em um outro aspecto, a invenção refere-se a uma formulação farmacêutica líquida, estável, adequada para administração parentérica, compreendendo um anticorpo anti-CD40 em um pH de 5,0-6,0 e um veículo farmaceuticamente aceitável, a formulação sendo estável durante um período de pelo menos três meses. A formulação, de preferência, tem uma concentração de anticorpo anti-CD40 de pelo menos 5 mg/mL. Em uma modalidade, a formulação compreende um anticorpo anti-CD40, acetato de sódio, cloreto de sódio e polissorbato 80. De preferência, ela compreende acetato de sódio a 20 mM, cloreto de sódio a 140 mM e 0,2 mg/mL de polissorbato 80. O anticorpo anti-CD40, de preferência, tem a seqüência de aminoácidos de um anticorpo selecionado do grupo consistindo no anticorpo 21.4.1 ou 3.1.1.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1 mostra a inibição de crescimento do tumor K562 CD40(-) por um anticorpo agonista de CD40, na presença de células imunes. Os

animais receberam uma única injeção (IP) de 21.4.1 ou KLH na altura de inoculação do tumor. O tamanho do tumor está descrito para cada animal individual, no dia 21, em mm^2 (10 animais por grupo). O estudo é representativo de pelo menos 5 estudos separados.

Figura 2 mostra a inibição do crescimento da linhagem celulars de tumor da mama humano BT 474 por um anticorpo agonista de CD40. Os valores representam medições de tumores individuais feitas no Dia 53 após a injeção usando 6 animais por grupo. O estudo é representativo de duas experiências separadas. A média para cada grupo de tratamento está indicada pela linha horizontal.

Figura 3 mostra inibição de crescimento de tumor CD40(+) por um anticorpo agonista de CD40, sozinho ou na presença de células imunes. Os animais receberam uma única dose de 21.4.1 na altura da indução de tumores. (a) Injetaram-se tumores sozinhos ou (b) juntamente com células T do sangue periférico humano e DC. Os pontos representam o tamanho dos tumores (mm^2) para cada animal individual. A média de cada grupo de tratamento (n = 10) está indicada pela linha horizontal. O estudo é representativo de pelo menos 3 experiências separadas.

Figura 4 mostra os efeitos de um anticorpo agonista de CD40 na retardação da mortalidade induzida por um linfoma de células B (Daudi). Os pontos referem-se ao número médio de animais sobreviventes, n=10 por grupo.

Figura 5 mostra a regressão de tumores causada por uma terapia de combinação com um anticorpo agonista de CD40 e cisplatina.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas

Tal como aqui é usado, o termo "anticorpo agonista de CD40" ou "anticorpo agonista anti-CD40" significa um anticorpo que especificamente se liga à molécula CD40 humana e aumenta uma ou mais atividades de CD40, em pelo menos cerca de 20%, quando adicionado à célula, tecido ou organismo expressando CD40. Em algumas modalidades, o anticorpo ativa a atividade de CD40 em pelo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 85%. Em algumas modalidades, a activação ocorre na presença de CD40L. Em

algumas modalidades, a atividade do anticorpo ativador é medida usando um ensaio de regulação positiva da molécula de superfície de sangue total. Em uma outra modalidade, a atividade do anticorpo ativador é medida usando um ensaio de células dendríticas para medir a liberação de IL-12. Em uma outra modalidade a atividade do anticorpo ativador é medida usando um modelo de tumor *in vivo*.

O termo "anticorpo" como aqui é usado refere-se a um anticorpo intacto, ou a um seu fragmento, que se liga e compete com o anticorpo intacto para a ligação específica. Os fragmentos de ligação são produzidos por técnicas de DNA recombinante, ou por clivagem enzimática ou química dos anticorpos intactos. Os fragmentos de ligação incluem Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv e anticorpos de cadeia simples. Deve-se compreender que a referência a um anticorpo intacto (*por exemplo*, total, de tamanho completo, etc.) inclui um anticorpo tendo uma deleção de lisina terminal na cadeia pesada, que normalmente ocorre durante a expressão recombinante.

De preferência, o anticorpo agonista de CD40, é um anticorpo humano. Como aqui é usado, o termo "anticorpo humano" significa um anticorpo em que as seqüências dos domínios variáveis e constantes derivam de seqüências humanas. Anticorpos humanos anti-CD40 estão descritos detalhadamente no pedido de patente pendente U.S. Nº 60/348 980, depositado em 9 de Novembro de 2001 e Pedido de Patente Internacional PCT Nº PCT/US02/36107 (agora publicado como WO 03/040170) depositado em 8 de Novembro de 2002, a totalidade da descrição da mesma é aqui incluída como referência. Os anticorpos humanos proporcionam uma vantagem substancial nos métodos de tratamento da presente invenção, uma vez que se espera que minimizem as respostas imunogênicas e alérgicas associadas à utilização de anticorpos não humanos em pacientes humanos.

Exemplos de anticorpos anti-CD40 humanos úteis para a presente invenção incluem anticorpos tendo as seqüências de aminoácidos dos anticorpos designados por 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1, 24.2.1, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1LL4M-L83V e

23.28.1L-C92A, assim como um anticorpo compreendendo uma região CDR ou variável de qualquer um dos anticorpos exemplificados.

Os anticorpos que reconhecem os mesmos epitopos ou epitopos semelhantes, ou uma porção dos mesmos, tal como qualquer dos anticorpos exemplificados podem ser igualmente úteis para a presente invenção. Ou seja, como será entendido pelos versados na técnica, face ao aqui descrito, um anticorpo que compete com um anticorpo da invenção (*por exemplo*, 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1, 24.2.1, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V e 23.28.1L-C92A e similares) pode ser útil como aqui descrito algures. Um anticorpo com interesse que compita com um anticorpo aqui exemplificado pode ser facilmente identificado usando métodos bem-conhecidos para a caracterização de anticorpos. Mais especificamente, ensaios para avaliação das características de ligação de um anticorpo, assim como para comparação daquelas características de ligação com as de um outro anticorpo, são do conhecimento dos versados na técnica. Tais métodos incluem, mas não estão limitados a ensaios baseados em ELISA, utilização de estudos de ligação BIAcore, assim como os detalhados no Pedido de Patente US Nº 2003/0157730A1 de Walker *et al.*

Pelo termo "competir", como aqui é usado relativamente a um anticorpo, significa que um primeiro anticorpo compete para a ligação com um segundo anticorpo, pelo que a ligação do primeiro anticorpo ao seu epitopo cognato decresce de forma detectável na presença do segundo anticorpo, comparativamente com a ligação do primeiro anticorpo na ausência do segundo anticorpo. A alternativa, em que a ligação do segundo anticorpo ao seu epitopo decresce também de forma detectável na presença do primeiro anticorpo, pode, mas não necessita de acontecer. Ou seja, um primeiro anticorpo pode inibir a ligação de um segundo anticorpo ao seu epitopo sem que o segundo anticorpo iniba a ligação do primeiro anticorpo ao respectivo epitopo. No entanto, sempre que cada um dos anticorpos iniba a ligação do outro anticorpo ao seu epitopo ou ligando cognato, quer no mesmo

grau ou em um grau superior ou inferior, os anticorpos são referidos como "competindo de forma cruzada" uns com os outros para a ligação aos respectivos anticorpos. Por exemplo, os anticorpos com competição cruzada podem ligar-se ao epitopo, ou porção do epitopo, a que os anticorpos da invenção (*por exemplo*, 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1LL4M-L83V e 23.28.1L-C92A) se ligam. A presente invenção abrange anticorpos competitivos e competitivos de forma cruzada. Independentemente do mecanismo pelo qual tal competição ou competição cruzada ocorre (*por exemplo*, impedimento estérico, alteração conformacional, ou ligação a um epitopo comum, ou porção do mesmo, e similares), os versados na técnica apreciarão, baseado nos ensinamentos aqui proporcionados, que tais anticorpos competitivos ou competitivos de forma cruzada estão abrangidos e podem ser úteis para os métodos aqui descritos.

Ainda, os anticorpos exemplificados podem ainda ser modificados por substituição, adição ou deleção de um ou mais resíduos de aminoácidos sem eliminar a capacidade do anticorpo para se ligar ao antígeno e exercer a sua função agonista. De fato, um anticorpo designado "3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V", compreende três substituições de aminoácidos na região variável da cadeia pesada, *isto é*, uma substituição de alanina por treonina no resíduo de aminoácido número 78, uma substituição de uma valina por alanina no resíduo de aminoácido número 88 e uma substituição de valina por alanina no resíduo de aminoácido número 97 (SEQ ID NO:9), tudo relativamente à seqüência de aminoácidos da região variável da cadeia pesada do anticorpo 3.1.1 (SEQ ID NO:1). Ainda, o anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V compreende também uma substituição de aminoácidos de leucina para metionina no resíduo de aminoácido número 4 e uma substituição de leucina para valina no resíduo de aminoácido número 83 na região variável da cadeia leve (SEQ ID NO:10) comparativamente com a seqüência de aminoácidos da região variável da cadeia leve do anticorpo 3.1.1 (SEQ ID NO:3). As seqüências de aminoácidos das regiões constantes

das cadeias pesadas (SEQ ID NO:2) e cadeias leves (SEQ ID NO:4) dos anticorpos 3.1.1 e 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V são os mesmos. O anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V é também referido como "3.1.1H3L2" para refletir que o anticorpo compreende três substituições de aminoácidos na cadeia pesada e duas substituições de aminoácidos na cadeia leve relativamente ao anticorpo 3.1.1.

Assim, Em algumas modalidades, os anticorpos exemplificados podem ser modificados por substituição, adição ou deleção de um a dez, um a cinco ou um a três resíduos de aminoácidos, *por exemplo*, em uma região CDR ou estrutural. Estes anticorpos exemplificados e métodos de produção dos mesmos estão descritos detalhadamente no pedido de patente pendente U.S. Nº 60/348 980, depositado em 9 de Novembro de 2001 e Pedido de Patente Internacional PCT Nº PCT/US02/36107 (WO 03/040170), depositado em 8 de Novembro de 2002. No entanto, a invenção não está limitada a estas, ou quaisquer outras substituições de aminoácidos. Por outro lado, os versados na técnica, providos dos ensinamentos aqui fornecidos, apreciarão que uma larga variedade de substituições de aminoácidos estão abrangidas pela invenção.

Os hibridomas 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 e 21.4.1 foram depositados de acordo com o Tratado de Budapeste, Na "American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, em 6 de Agosto de 2001. Os hibridomas 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 e 24.2.1 foram depositados na ATCC em 16 de Julho de 2002. Aos hibridomas foram atribuídos os seguintes números de depósito:

Hibridoma	Nº de depósito
3.1.1(LN 15848)	PTA-3600
7.1.2 (LN 15849)	PTA-3601
10.8.3 (LN15850)	PTA-3602
15.1.1 (LN 15851)	PTA-3603
21.4.1 (LN 15853)	PTA-3605
21.2.1 (LN 15874)	PTA-4549
22.1.1 (LN 15875)	PTA-4550

23.5.1 (LN 15855) PTA-4548

23.25.1 (LN 15876) PTA-4551

23.28.1 (LN 15877) PTA-4552

23.29.1 (LN 15878) PTA-4553

24.2.1 (LN 15879) PTA-4554

As seqüências destes anticorpos são conhecidas e descritas em WO 03/040170. Por conveniência, as seqüências de aminoácidos das cadeias pesada e leve de dois destes anticorpos estão apresentadas abaixo:

Anticorpo 3.1.1:

3.1.1: Seqüência protéica da cadeia pesada	Variável (SEQ ID NO:1): QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISKDGGNKYHADSVKGRFTISRDNSKNALYLQMNSLRVEDTA VYYCVRRGHQLVLGYYYYNGLDVWGQGTTVTVSS Constante (SEQ ID NO:2): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT KVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSV LTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
3.1.1: Seqüência protéica da cadeia leve	Variável (SEQ ID NO:3): DIVLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPG QSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDVGVYY CMQALQTPRTFGQGTKVEIK Constante (SEQ ID NO:4): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

3.1.1H-A78T-V88A- V97A: Seqüência protéica da cadeia pesada	Variável (SEQ ID NO:9): QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRGHQLVLGYYYYNGLDVWGQG-TTVTVSS Constante (SEQ ID NO:2): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
3.1.1L-L4M-L83V: Seqüência protéica da cadeia leve	Variável (SEQ ID NO:10): DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYL QKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIK Constante (SEQ ID NO:4): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Anticorpo 21.41:

21.4.1: Seqüência protéica da cadeia pesada	Variável (SEQ ID NO:5): QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQA PGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAY MELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWGQG-TLVTVSS Constant (SEQ ID NO:6): ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCN VDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
21.4.1: Seqüência protéica da cadeia leve	Variável (SEQ ID NO:7): DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIYSWLAWYQQKPG KAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK Constante (SEQ ID NO:8): RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Assim, a seqüência de aminoácidos do anticorpo 21.4.1 compreende as seqüências de aminoácidos descritas em SEQ ID NOs: 5-8, a seqüência de aminoácidos do anticorpo 3.1.1. compreende as seqüências de aminoácidos descritas em SEQ ID NOs:1-4 e a seqüência de aminoácidos do anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V compreende as seqüências descritas em SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:4. Os aminoácidos que diferem entre 3.1.1 e 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/ 3.1.1L-L4M-L83V estão sublinhados.

Será óbvio, com base na descrição aqui proporcionada, que um anticorpo 3.1.1 da invenção abrange qualquer combinação das regiões variáveis das cadeias pesada e/ou leve aqui descritas. Ou seja, um anticorpo pode compreender qualquer combinação de regiões variáveis, incluindo, mas não estando limitada a 3.1.1H (SEQ ID NO:1)/3.1.1L (SEQ ID NO:3), 3.1.1H (SEQ ID NO:1)/3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO:10), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO:9)/3.1.1L (SEQ ID NO:3) e, mais de preferência, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO:9)/3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO:10). No entanto, a invenção não está de forma alguma limitada a quaisquer outras combinações particulares.

Em determinadas modalidades, o tratamento de tumores inibe a proliferação de células cancerígenas, inibe ou evita um aumento do peso ou volume do tumor e/ou causa um decréscimo no peso ou volume do tumor. Em algumas modalidades, o tratamento do tumor prolonga a sobrevivência do paciente. Em certas modalidades, o crescimento do tumor é inibido em pelo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70% ou 75%, comparativamente com os não tratados. Em algumas modalidades, o tumor é CD40 positivo. Em algumas modalidades, o tumor é CD40 negativo. O tumor pode ser um tumor sólido ou um tumor não sólido, como seja um linfoma. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CD40 é administrado a um paciente que tem um tumor que é cancerígeno.

Os pacientes que podem ser tratados com anticorpos anti-CD40 ou porções de anticorpo dos mesmos incluem, mas não estão limitados a

pacientes que foram diagnosticados como tendo câncer do cérebro, câncer do pulmão, câncer dos ossos, câncer pancreático, câncer da pele, câncer da cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intra-ocular, câncer uterino, câncer do ovário, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer gástrico, câncer colorrectal, câncer do cólon, tumores ginecológicos (*por exemplo*, sarcomas uterinos, carcinoma das trompas de falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do cérvix, carcinoma da vagina ou carcinoma da vulva), câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino (*por exemplo*, câncer da tiróide, paratiróide ou glândulas adrenais), sarcomas dos tecidos moles, leucemia, mieloma, mieloma múltiplo, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer da próstata, leucemia crônica ou aguda, tumores sólidos da criança, doença de Hodgkin, linfomas linfocíticos, linfoma não Hodgkin, câncer da bexiga, câncer do fígado, câncer do rim ou da uretra (*por exemplo*, carcinoma das células renais, carcinoma da pelvis renal) ou neoplasmas do sistema nervoso central (*por exemplo*, linfoma primário do SNC, tumores do eixo espinhal, gliomas estaminais do cérebro ou adenomas da pituitária), glioma ou fibrossarcoma.

Como aqui é usado, o termo "paciente" refere-se a um ser humano ou mamífero não humano que exprime um CD40 que dá reação cruzada (*por exemplo*, um primata, macaco cinomolgus ou macaco rhesus). De preferência, o paciente a ser tratado é um ser humano.

Como aqui é usado, o termo "regime de dosagem intermitente" significa um regime de dosagem que compreende a administração de um anticorpo agonista de CD40, seguido de um período de repouso.

Como aqui é usado, o termo "período de repouso" significa um período de tempo durante o qual não é dado ao paciente um anticorpo agonista de CD40. Por exemplo, se o anticorpo foi dado em uma base diária, haverá um período de descanso se a administração diária for descontinuada, *por exemplo*, durante alguns dias ou semanas. Se uma dose for administrada segundo um protocolo diferente, um período de repouso ocorrerá sempre que a dosagem for descontinuada durante algum tempo. Como alternativa, pode ocorrer um período de repouso quando a concentração do anticorpo é

mantida em um nível subterapêutico.

Em uma modalidade, o anticorpo não é dado após o segundo período de descanso, *isto é*, quando o método da invenção envolve dois ciclos, a droga não necessita de ser administrada após o segundo ciclo de repouso.

De preferência, durante o período de repouso, a concentração no plasma do anticorpo é mantida em um nível subterapêutico.

O período de dosagem e/ou a dose do anticorpo pode ser igual ou diferente entre ciclos.

O tempo total de tratamento (*isto é*, o número de ciclos de tratamento) variará de paciente para paciente, baseado na avaliação médica e em fatores particulares do paciente a ser tratado. Em geral, o tratamento é administrado até se obter uma dose satisfatória. Em certas modalidades da invenção, o período de tratamento compreende 2-20, 2-15, 2-10, 2-7, 2-5 ciclos ou 2-3 ciclos.

O anticorpo pode ser administrado por qualquer meio pretendido, incluindo, *por exemplo*, administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, parentérica, intratumoral e transdérmica. Em uma modalidade, o anticorpo anti-CD40 é administrado intravenosamente. Em uma outra, é administrado usando um sistema de microagulha; tais dispositivos são bem-conhecidos e incluem, *por exemplo*, o sistema descrito em WO 03/084598.

Quando administrado em combinação com um inibidor da replicação de DNA, *por exemplo*, cisplatina, o anticorpo pode ser administrado antes, durante ou após administração do inibidor.

Em um aspecto, a invenção refere-se a uma solução aquosa para injeção intravenosa, com o pH entre cerca de 5,0 e 6,0, de preferência a pH próximo de 5,5. Tal solução pode ser formulada com acetato de sódio (tri-hidrato), ácido acético (glacial), polissorbato 80, cloreto de sódio e água. Prefere-se que a solução de anticorpo seja guardada refrigerada a temperaturas entre 2°C e 8°C e não congelada.

De acordo com a presente invenção, são igualmente proporcionados métodos de tratamento de um tumor, em um paciente necessitado de

tal tratamento, compreendendo a administração ao referido paciente de uma combinação de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo agonista de CD40 e uma quantidade terapeuticamente eficaz de um inibidor da replicação de DNA, *por exemplo*, um derivado de platina. Em certas modalidades, um anticorpo agonista de CD40 funciona em combinação sinergística com um composto derivado de platina, especialmente cisplatina, de forma que o efeito antitumoral da combinação seja superior ao previsto para a administração de cada composto por si só.

Os derivados de platina são um grupo de compostos bem conhecido que apresentam a sua atividade antitumoral ao interferir com a replicação de DNA. Em certas modalidades, os derivados de platina são selecionados do grupo consistindo em cisplatina (cis-diaminodicloroplatina, Ver Merck Index), carboplatina e oxaliplatina.

A invenção será melhor entendida através da referência aos exemplos que se seguem. No entanto, estes não deverão ser pensados como limitantes do âmbito da invenção. Todas as citações da literatura são aqui incluídas como referência.

Exemplos

Exemplo 1: Efeitos dos anticorpos nas células de nódulos linfáticos de pacientes com câncer

Foram estudados os efeitos de um anticorpo humano anti-CD40 (21.4.1) sobre as células de nódulos linfáticos, obtidas de pacientes com câncer, estimuladas com células tumorais autólogas.

As células dos nódulos linfáticos e tumores foram colhidas de pacientes com carcinoma das células renais, câncer das células pequenas do pulmão, carcinoma das células de transição da bexiga, câncer do cólon, câncer da próstata e câncer da cabeça e pescoço. As células dos nódulos linfáticos foram colocadas em cultura juntamente com tumores tratados com colagenase irradiados (recuperados do mesmo paciente) na presença ou ausência de 21.4.1 (1 μg/mL; 6,7 nM). A proliferação foi avaliada usando ^{3}H-timidina, 96 horas mais tarde. O número de células produtoras de INFγ foi avaliado por ELISPOT, após nova estimulação.

O anticorpo aumentou o número de INFγ+ de células T positivas em culturas de células dos módulos linfáticos estimuladas com amtígeno tumoral. Adicionalmente, a proliferação destas células dos módulos linfáticos em resposta ao antígeno tumoral foi aumentada 3 a 4 vezes.

O anticorpo aumentou a capacidade de proliferação e de produção de citocinas das células dos nódulos linfáticos obtidas a partir de pacientes com câncer quando estimuladas com antigénios tumorais.

Exemplo 2: Ligação dos anticorpos ao receptor Fc

Estudou-se a ligação de um anticorpo anti-CD40 (21.4.1) aos receptores Fc nos leucócitos humanos e de cynomolgus.

Os estudos de citometria de fluxo indicaram que os tipos de FcR FcγRII (CD32) e FcγRIII (CD16), assim como níveis muito baixos de FcγRI (CD64), foram expressos em leucócitos humanos. A ligação de 21.4.1 aos receptores Fc (FcR) em leucócitos do sangue periférico humano ou do cynomolgus foi determinada usando ^{125}I-21.4.1 e um mAb testemunha IgG1 humana. Os leucócitos humanos derivados de doadores normais ou leucócitos de *Macaca fascicularis* foram isolados a partir de sangue total usando plasma gel e bem lavados para permitir a dissociação de imunoglobulinas séricas ligadas ao receptor. A centrifugação através de uma almofada de sacarose foi usada para separar anticorpos ligados a células e livres. Foram realizados estudos a 4°C na presença de azida de sódio para evitar a internalização dos receptores.

21.4.1 foi testado através da ligação específica a FcR usando como competidor excesso de anticorpo condizente com o isotipo IgG2 humano não marcado. A ligação específica de ^{125}I-21.4.1 a FcR em leucócitos humanos (n=5 doadores) foi de –1,0±8,5% e a ligação específica a FcR em leucócitos de *Macaca fascicularis* (n=4) foi de 15±13%. A adição de um excesso de 500 vezes de 21.4.1 não marcado, que bloquearia qualquer ligação específica de ^{125}I-21.4.1 aos receptores CD40 de leucócitos assim como a FcR, demonstrou 49% e 67% de ligação específica de ^{125}I-21.4.1 aos receptores CD40 em leucócitos humanos e de *Macaca fascicularis*, respectivamente (a % de ligação específica a CD40 foi calculada subtraindo a % de

ligação a FcR da % de ligação específica). Como controle, ^{125}I-IgG1 mostrou consistentemente ligação específica a leucócitos humanos e de *Macaca fascicularis*. A ligação específica do anticorpo testemunha IgG1 a FcR de leucócitos humanos e de *Macaca fascicularis* corresponde respectivamente a 56% e 51% da radioatividade total ligada.

Estes estudos indicam que o anticorpo apresenta ligação específica mínima aos receptores Fc em leucócitos humanos e de *Macaca fascicularis*s.

Exemplo 3: Ensaio de produção de citocinas no sangue total

Testou-se um anticorpo anti-CD40 (21.4.1) relativamente à sua capacidade para induzir a produção de citocinas em sangue total humano, não estimulado, usando um ensaio de sangue total *in vitro* que está correlacionado com a indução da produção de citocinas mediada por anticorpos em humanos. 21.4.1 foi testado a 1, 10 e 100 μg/mL, juntamente com IgG1 de murino anti-CD3 humano como controle positivo, o qual induz a produção de citocinas através de uma via mediada por Fc, e LPS como segundo controle positivo, o qual induz citocinas através da estimulação de macrófagos. Os doadores usados incluíram indivíduos que responderam a anticorpo de murino e a LPS (4 doadores), assim como indivíduos que apenas responderam a LPS (3 doadores). Sangue total heparinizado foi cultivado com 21.4.1 durante 5 horas e o plasma foi colhido e analisado relativamente ao fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interferon gama (INF-γ) e interleucina-6 (IL-6) por ELISA (usando kits comerciais). As culturas foram também incubadas durante 48 horas e analisadas relativamente a interleucina-1 beta (IL-1β).

Não foram detectadas citocinas no plasma de sangue humano cultivado com 1 ou 10 μg/mL de 21.4.1. Apenas um doador tratado com 100 μg/mL do anticorpo apresentou níveis mensuráveis das duas citocinas (34 pg/mL de TNF-α e 90 pg/mL de IL-6). Este doador foi novamente testado e não apresentou indução detectável de TNF-α ou IL-6. Não houve aumento de INFγ ou de IL-1β em qualquer uma das amostras.

Estes estudos indicaram que 21.4.1 não induz citocinas inflamatórias em sangue total humano.

Exemplo 4: Farmacodinâmicas e farmacocinética dos anticorpos

Um anticorpo anti-CD40 (21.4.1) foi administrado intravenosamente em várias doses (1 mg/kg n = 4, 3 mg/kg n=4, 5 mg/kg n= 2 e 10 mg/kg n=2) a cynomolgus. O sangue heparinizado foi colhido dos macacos em várias alturas, antes e após a dose. O sangue foi dividido em pequenas amostras e manchado. Os dados foram adquiridos usando um Becton Dickinson FACSCalibur e analisado com o programa CellQuest. Os resultados foram calculados como o número de vezes que aumentou a intensidade de fluorescência média comparativamente com os valores pré-dose.

A expressão de MHC Classe II, reflectindo o estado de activação e a capacidade de apresentação de antígeno de células B, aumentou 2,5 a 3 vezes em 24 horas após dosagem de dotadas as doses testadas, não se observando uma relação clara de dose-resposta. A expressão de CD23, um outro marcador da activação de células B, foi avaliada em 2 animais a 3 mg/kg e um animal a 10 mg/kg. A expressão de CD23 aumentou ≥20 vezes em 24 horas após dosagem sem se observar efeito da dose. A regulação positiva de ambos os marcadores de superfície persistiu (aumento ≥2 vezes) enquanto que os níveis de 21.4.1 permaneceram acima de 1 μg/mL. Os níveis da molécula CD71 (receptor da transferrina) e da molécula coestimuladora CD86 também mostraram regulação positiva moderada, enquanto que a expressão de CD80 não alterou significativamente.

21.4.1 regula positivamente marcadores de superfície *in vivo* em células B de *Macaca fascicularis*. A expressão de MHC Classe II e de CD23 em células CD20+ aumenta com o tratamento e 1 mg/kg (correspondendo a um C_{max} de ~20 μg/mL e uma exposição de ≥0,1 μg/mL durante 4 dias) parece produzir uma resposta farmacodinâmica saturante em células B de *Macaca fascicularis*. A duração desta resposta foi mais longa em doses mais elevadas.

As propriedades farmacocinéticas de um anticorpo anti-CD40 (21.4.1) foram analisadas em cynomolgus após administração intravenosa (IV) de uma única dose de 1, 3, 5 ou 10 mg/kg. 21.4.1 caracterizou-se pela eliminação sistémica baixa (0,0133 a 0,0635 mL/min/kg) e um pequeno vo-

lume de distribuição no estado de equilíbrio (0,0459 a 0,0757 L/kg), resultando em uma semivida de eliminação média aparente de 0,75 a 2,0 dias (Tabela 1). As farmacocinéticas de 21.4.1 pareceram ser dependentes na gama de doses avaliadas. Os valores de eliminação de um modo geral diminuíram com o aumento da dose de 1 para 10 mg/kg e a semivida de eliminação média aparente aumentou de 0,75 dia a 1 mg/kg para 2,0 dias a 10 mg/kg. O volume de distribuição no estado de equilíbrio foi semelhante em diferentes doses (média de 0,0575 L/kg).

A eliminação dependente de dose observada pode ser em parte devida à ligação de 21.4.1 aos receptores CD40 que são largamente expressos em tecidos normais e a subseqüente internalização e eliminação do complexo anticorpo-receptor. O desenvolvimento da resposta de primatas antianticorpos humanos (PAHA) pode também contribuir para a eliminação acelerada nalguns macacos. PAHA foi avaliado apenas após as concentrações séricas individuais de 21.4.1 atingirem o limite inferior de quantificação (LLOQ, 0,03 μg/mL) uma vez que a presença de 21.4.1 no soro a testar interfere com o ensaio para PAHA. Os anticorpos anti-21.4.1 foram detectados em todos os macacos nos grupos de dosagem de 3, 5 e 10 mg/mL nos dias 14 a 28 após administração do anticorpo.

Tabela 1

Parâmetros farmacocinéticos Médios (± DP) de 21.4.1 em cynomolgus após uma única administração IV de 1, 3, 5 e 10 mg/kg

Dose (mg/kg)	N/ Gênero	CL (mL/min/kg)	Vdss (L/kg)	$T_{1/2}$ (dia)	$AUC_{(0\infty)}$ μg.h/mL
1	2/sex	0,0635±0,0245	0,0757±0,0265	0,75±0,21	298±126
3	2/sex	0,0213±0,0055	0,0459±0,0055	1,4±0,3	2460±600
5	2F	0,0174	0,0488	1,4	4790
10	1/sex	0,0133	0,0529	2,0	12500

Exemplo 5: Atividade antitumoral dos anticorpos

A atividade inibidora do crescimento de tumores de um anticorpo CD40 (21.4.1) foi determinada em camundongos SCID-bege injetados SC com células tumorais sozinhas ($1x10^7$) ou com DC humanas (1×10^5) e célu-

las T (5×10^5) do mesmo doador. A proporção de células tumorais relativamente a células DC e T foi de 100:1:5. A menos que de outra forma seja indicado, os resultados são apresentados em termos do tamanho do tumor em mm^2 em um ponto de tempo fixo predeterminado (a partir das experiências de cinética) como sendo a altura em que o crescimento do tumor nos animais testemunha atingiu um tamanho de 300-400 mm^2 e deixou de ser humano para continuar a experiência. Em todos os casos, apenas uma injeção de 21.4.1 foi administrada que teve uma $T_{1/2}$ de >30 dias em camundongos SCID-bege.

Exemplo 5(a): Efeitos dos anticorpos nos tumores humanos CD40(-)

Avaliaram-se os efeitos do anticorpo CD40 (21.4.1) no crescimento de tumores CD40(-) (*por exemplo* eritroleucemia e carcinoma do cólon). Em particular, foram escolhidos tumores K562 para avaliar a eficácia de 21.4.1 contra um tumor CD40(-) pouco imunogênico (negativo para classe I e classe II).

Camundongos SCID-bege foram injetados com o tumor eritroleucêmico CD40(-), K562 (ATCC CCL-243) sozinho ou na presença de células T e DCs de sangue periférico humano. Os animais receberam uma única injeção IP de 21.4.1 na altura da injeção do tumor ou 5 dias mais tarde usando vários níveis de doses.

Uma única injeção IP de 21.4.1 resultou na inibição dependente de dose do crescimento de tumores K562 quando as células imunes estavam presentes, conforme ilustrado no Dia 21 após a inoculação de tumores (Figura 1). A quantidade de 21.4.1 para causar uma inibição de 50% do crescimento de tumores foi de 0,005 mg/kg correspondendo a uma concentração sérica C_{max} de 0,05 μg/mL. Resultados semelhantes foram observados com carcinoma do cólon CD40(-), Lovo (ATCC CCL-229). Os resultados foram idênticos quando 21.4.1 foi administrado no Dia 0 ou Dia +5 relativamente à inoculação de tumores. O crescimento destes tumores CD40(-) não foi inibida por 21.4.1 na ausência de células imunes.

21.4.1 evita o crescimento de tumores CD40(-) quando as células imunes estão presentes, sugerindo aumento da atividade antitumoral

mediada pelo sistema imune. Isto foi demonstrado contra um carcinoma do cólon e contra um tumor eritroleucêmico. Esta atividade antitumoral foi também demonstrada usando o anticorpo 3.1.1 contra o carcinoma do cólon e o anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V (IC50<0,01 mg/kg) no tumor eritroleucêmico. Assim, os dados aqui descritos demonstram que o anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V tem a atividade *in vivo* do anticorpo 3.1.1. Estes resultados de tumores *in vivo* apoiam ainda que dada a semelhança de dados obtidos *in vitro* onde os dois anticorpos foram comparados, o anticorpo 3.1.1 e o anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V têm desempenho semelhante *in vivo*. Assim, os resultados obtidos usando 3.1.1 aplicam-se a 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V neste e em outros ensaios.

Exemplo 5(b): Efeitos dos anticorpos no crescimento de tumores humanos da mama e da próstata

Examinaram-se os efeitos de um anticorpo anti-D40 (21-4-1) na prevenção do crescimento de tumores da mama e da próstata.

Camundongos SCID-bege foram inoculados com o tumor da mama humano, BT 474 (ATCC HTB-20), SC, juntamente com células T e DC de sangue periférico humano. Os animais receberam uma única dose de 21.4.1 (IP) na altura da injeção do tumor.

Como se mostra na Figura 2, uma única injeção de 21.4.1 evitou o crescimento de células BT 474 na presença de células imunes. A quantidade de 21.4.1 necessária para causar uma redução de 50% no crescimento de tumores foi de 0,005 mg/kg correspondendo a uma concentração sérica C_{max} de 0,05 μg/mL. Foram obtidos resultados semelhantes contra a linhagem celular de câncer da próstata humana, PC-3 (ATCC CRL-1435). Isto foi igualmente demonstrado usando o anticorpo 3.1.1 e pode ser esperado para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V.

21.4.1 evita o crescimento de tumores humanos da mama e da próstata.

Exemplo 5(c): Efeitos anti-tumorais dos anticorpos sobre os tumores CD40(+)

Foram estudados os efeitos de um anticorpo anti-CD40 (21.4.1) na atividade antitumoral contra tumores CD40(+) e alterações na eficácia na presença e ausência de células imunes.

Camundongos SCID-bege foram injetados subcutaneamente com o linfoma de células B Raji CD40(+) (ATCC CCL-86) (SC) seguido de uma única dose de 21.4.1 (IP) na altura da injeção dos tumores. Alguns animais foram também injetados com células T e DC humanas. O crescimento de tumores foi avaliado no Dia 21.

Como se mostra na Figura 3, a quantidade de 21.4.1 que causa uma inibição de 50% do crescimento dos tumores na ausência de células imunes foi de 0,02 mg/kg, correspondendo a uma concentração sérica C_{max} de 0,2 μg/mL. Quando as células tumorais foram coinjetadas com células imunes, a quantidade de 21.4.1 necessária para causar uma inibição de 50% do crescimento de tumores diminuiu 20 vezes para 0,001 mg/kg (concentração sérica C_{max} = de 0,01 μg/mL).

Estes resultados ilustram que 21.4.1 tem atividade antitumoral direta contra tumores CD40(+). Esta observação foi também feita para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V IC50 < 0,01 mg/kg). Esta atividade antitumoral para o anticorpo 21.4.1 foi aumentada quando as células imunes estavam presentes e isto foi também demonstrado com o anticorpo 3.11 e espera-se o mesmo para o anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V.

Exemplo 5(d): Efeitos antitumorais dos anticorpos no linfoma das células B

A capacidade do anticorpo anti-CD40 de acordo com a invenção (21.4.1) para retardar a mortalidade em um modelo de tumor sistêmico CD40(+) foi avaliada usando um linfoma de células B.

Camundongos SCID-bege foram injetados IV com o linfoma de células B Daudi (ATCC CCL-213). 21.4.1 foi administrado como uma única injeção (IP) na altura da injeção do tumor. A mortalidade foi monitorizada durante 58 dias.

Como se mostra na Figura 4, uma única injeção de 21.4.1 evitou

a mortalidade induzida por uma linhagem celulars tumorais administrada sistemicamente.

21.4.1 retarda a mortalidade em um modelo de tumor sistémico CD40(+) usando um linfoma de células B. Isto foi também demonstrado usando 3.1.1 e resultados semelhantes são esperados para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V.

Exemplo 6: Efeitos terapêuticos de anticorpos em combinação com cisplatina

Avaliaram-se os efeitos terapêuticos de um anticorpo anti-CD40 (21.4.1) na prevenção do crescimento de tumor da mama humano, sozinho e na presença de cisplatina.

Camundongos SCID-bege foram injetados SC com o tumor da mama, BT474. O anticorpo (1 mg/kg, IP) e/ou cisplatina (2,5 mg/kg, IP) foram administrados como uma injeção única uma vez os tumores terem atingido um tamanho de 200 mm^2. O crescimento dos tumores foi medido no dia 84 após inoculação.

Como se mostra na Figura 4, uma única injeção de 21.4.1 ou cisplatina evitou o crescimento de tumores. No entanto, a combinação de ambos os tratamentos conduziu à regressão completa dos tumores.

21.4.1 evita o crescimento de tumores quando administrado por si só uma vez estabelecidos os tumores e causa a regressão de tumores quando administrado em combinação com cisplatina. Isto foi também demonstrado usando o anticorpo 3.1.1, assim como é igualmente provável para 3.1.1H-A78T-V88A-V97A/3.1.1L-L4M-L83V.

Exemplo 7: Farmacocinética de múltiplas doses de anticorpo

Em um estudo de múltiplas doses, 21.4.1 foi administrado intravenosamente a cynomolgus (2/sex/dose), nas dosagens de 0,3, 1,0 e 10 mg/kg nos Dias 1, 3, 5, 7 e 9 para um total de 5 doses. Colheu-se o sangue nos Dias 1 e 9 antes da dosagem e 0,5, 6 e 24 horas após dosagem e antes da dosagem e 0,5 horas após dosagem no Dia 5 para medir as concentrações séricas das drogas. A exposição sistémica a 21.4.1, conforme avaliado por meio de C_{max} e $AUC_{(0-24)}$ médias, aumentou com o aumento da dose de 0,3 para 10 mg/kg no Dia 1 e Dia 9 (Tabela 2). Exposições semelhantes (C_{max}

média e AUC média) foram observadas nos Dias 1 e 9 nos grupos das dose 0,3 e 1 mg/kg. No grupo da dose de 10 mg/kg, os valores de C_{max} média e $AUC_{(0-24)}$ média aumentaram 2,6 e 2,8 vezes, respectivamente, do Dia 1 para o Dia 9. Não foram observadas diferenças na exposição associadas ao sexo.

Tabela 2

Parâmetros farmacocinéticos médios (±DP) de 21.4.1 em cynomolgus nos Dias 1 e 9 após administração IV com um dia de intervalo.

Dose[a] (mg/kg)	Dia	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	$AUC_{(0-24)}$ (µg.h/mL)
0,3	1	4,67±1,71	1,9±2,8	47,7±15,4
1,0	9	7,4±2,9	0,5±0,0	55,6±47,1
10	1	26,7±5,1	0,5±0,0	387±59
	9	12,3±9,1	1,9±2,8	219±151
	1	226±29	1,9±2,8	4130±600
	9	577±163	3,3±3,2	11400±2100

[a]N=2/sex/dose

Exemplo 8: Formulação de anticorpos

O anticorpo CD40 foi concentrado para aproximadamente 11,0 mg/mL ± 0,8 mg/mL usando uma unidade de ultrafiltração contendo cassetes com limite de exclusão de 30 KDa. O concentrado foi então diafiltrado contra tampão acetato de sódio 20 mM/cloreto de sódio 140 mM, pH 5,5. Adicionou-se 2% de uma solução de polissorbato 80 ao produto diafiltrado concentrado para se atingir uma concentração final de 0,02% de polissorbato 80.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação farmacêutica líquida, estável, adequada para administração parentérica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo agonista de CD40 selecionado dentre o grupo consistindo de 3.1.1, e 3.1.1 H- A78T-V88A-V97A/3.1.1 L-L4M-L83V, e 21.4.1 e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que a formulação está em um pH 5,0 – 6,0, em que a cadeia pesada do anticorpo 3.1.1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 1, a cadeia leve do anticorpo 3.1.1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3, a cadeia pesada do anticorpo 3.1.1 H - A78T-V88A-V97A / 3.1.1 L-L4M-L83V compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9, a cadeia leve do anticorpo 3.1.1 H - A78T-V88A-V97A / 3.1.1 L-L4M-L83V compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 10, a cadeia pesada do anticorpo 21.4.1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 5 e a cadeia leve do anticorpo 21.4.1 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ. ID NO: 7, e em que o veículo farmaceuticamente aceitável compreende acetato de sódio, cloreto de sódio e polissorbato 80.

2. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que apresenta uma concentração do referido anticorpo CD40 de pelo menos cerca de 5 mg/mL.

3. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a quantidade de acetato de sódio é cerca de 20 mM e a quantidade de cloreto de sódio é cerca de 140 mM.

4. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a quantidade de polissorbato 80 é cerca de 0,02%.

FIG. 1

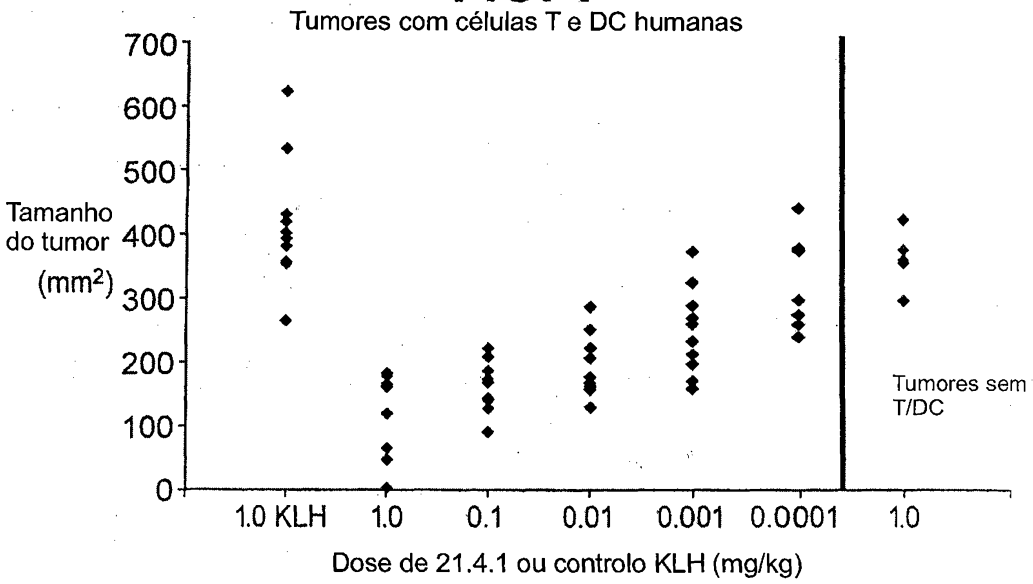

Tumores com células T e DC humanas
Tamanho do tumor (mm²)
700
600
500
400
300
200
100
0
1.0 KLH
1.0
0.1
0.01
0.001
0.0001
1.0
Tumores sem T/DC
Dose de 21.4.1 ou controlo KLH (mg/kg)

FIG. 2

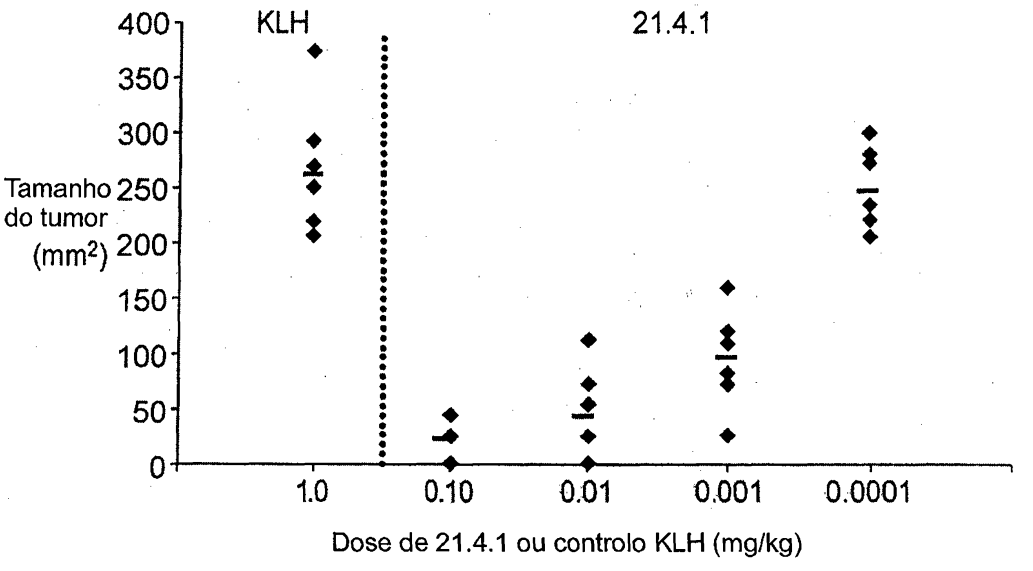

KLH
21.4.1
Tamanho do tumor (mm²)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
1.0
0.10
0.01
0.001
0.0001
Dose de 21.4.1 ou controlo KLH (mg/kg)

FIG. 3

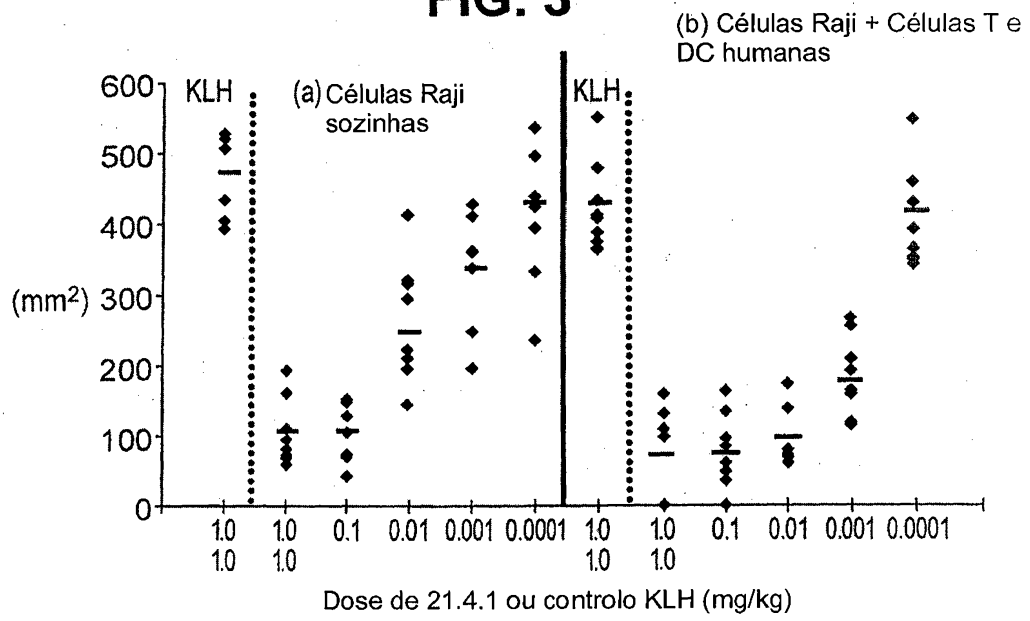

(b) Células Raji + Células T e DC humanas
600
500
400
(mm²) 300
200
100
0
KLH
(a) Células Raji sozinhas
KLH
1.0 1.0
1.0 1.0
0.1
0.01
0.001
0.0001
1.0 1.0
1.0 1.0
0.1
0.01
0.001
0.0001
Dose de 21.4.1 ou controlo KLH (mg/kg)

FIG. 4

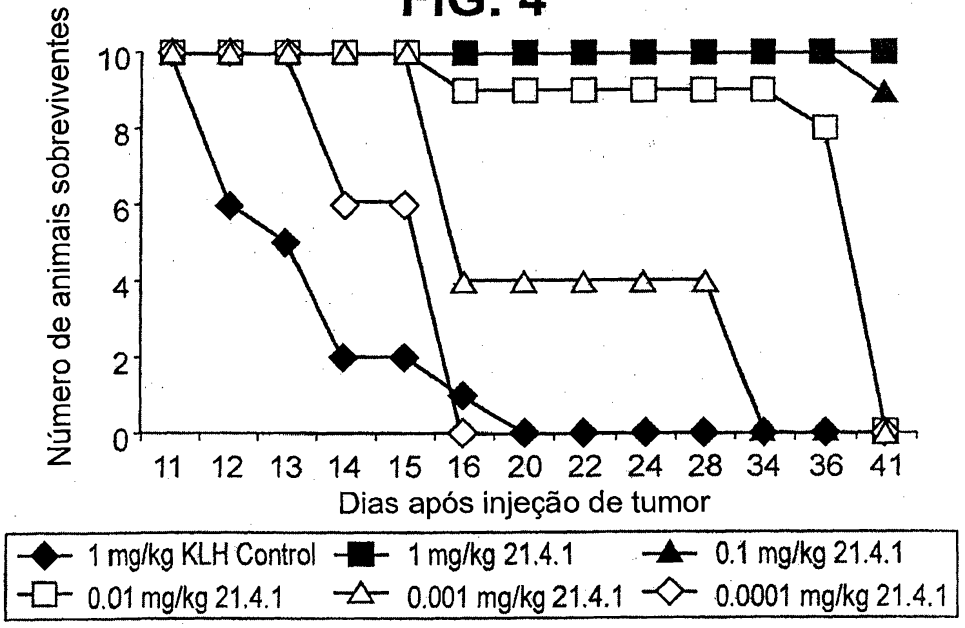
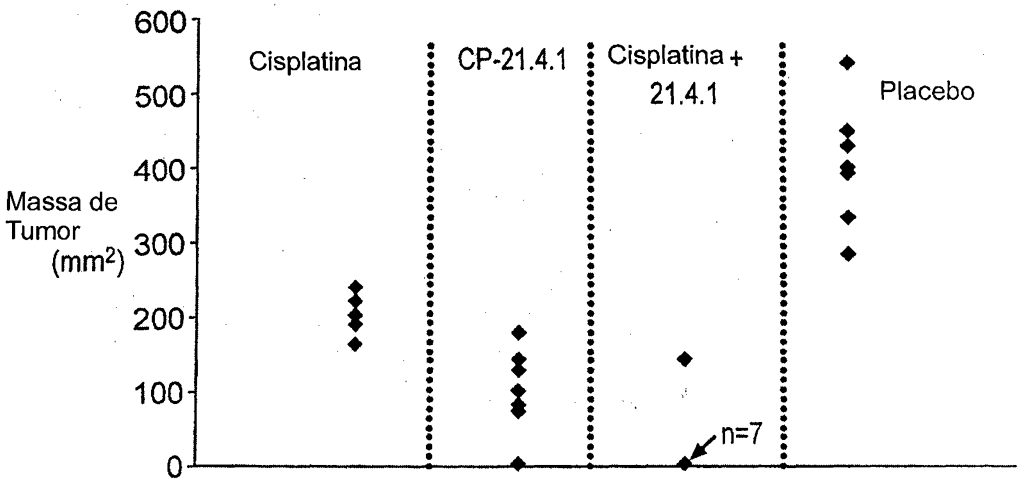

Número de animais sobreviventes
10
8
6
4
2
0
11 12 13 14 15 16 20 22 24 28 34 36 41
Dias após injeção de tumor
1 mg/kg KLH Control
1 mg/kg 21.4.1
0.1 mg/kg 21.4.1
0.01 mg/kg 21.4.1
0.001 mg/kg 21.4.1
0.0001 mg/kg 21.4.1

FIG. 5


600
500
400
300
200
100
0
Massa de Tumor (mm2)
Cisplatina
CP-21.4.1
Cisplatina + 21.4.1
Placebo
n=7