



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

(11) PI 0417266-3 B1



(22) Data do Depósito: 24/12/2004

(45) Data de Concessão: 28/04/2020

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL, SEU USO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C12N 15/09; C07K 16/28; C12P 21/08; A61K 39/395; A61P 37/00.

(30) Prioridade Unionista: 25/12/2003 JP 2003-431408.

(73) Titular(es): KYOWA KIRIN CO., LTD..

(72) Inventor(es): NOBUAKI TAKAHASHI; TORU MIURA; YOSHINORI KITAGAWA; AKI HIRANO.

(86) Pedido PCT: PCT JP2004019750 de 24/12/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/063981 de 14/07/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/06/2006

(57) Resumo: "MUTANTES DE ANTICORPO ANTI-CD40". Um mutante de um anticorpo anti-CD40 potencialmente terapêutico é proporcionado, mutante o qual tem atividades de ADCC e CDC reduzidas projetado para ser otimizado como um agente farmacêutico. Um mutante de anticorpo anti-CD40 agonista compreendendo mutação e/ou substituição de pelo menos um aminoácido em uma região constante para reduzir as atividades de ADCC e/ou CDC no mesmo e um mutante de um anticorpo anti-CD40 antagonista compreendendo pelo menos uma mutação ou substituição em uma região constante para reduzir as atividades de ADCC e/ou CDC no mesmo, ambos os mutantes tendo pelo menos uma região de dobradiça derivada de uma IgG2 humana.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTICORPO MONOCLONAL, SEU USO E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

Campo Técnico

A presente invenção se refere a um anticorpo anti-CD40 o qual reconhece CD40 o qual é um tipo de moléculas da membrana celular associadas à imunidade. Ainda, a presente invenção se refere a um anticorpo com uma mutação na região constante do anticorpo humano ou com uma subclasse tendo sua porção substituída de forma a diminuir uma atividade de ADCC e/ou CDC, ao mesmo tempo em que mantém uma atividade antagonista ou agonista.

Técnica Antecedente

1. CD40

CD40 é um antígeno tendo um peso molecular de 50 kDa o qual está presente sobre a superfície da membrana celular e expresso em células B, células dendríticas (DCs), alguns tipos de células cancerígenas e células epiteliais tímicas. CD40 é conhecido por exercer um papel importante na proliferação e diferenciação de células B e DCs. O CD40 foi identificado como um antígeno expresso sobre a superfície de células B humanas (E. A. Clark e colaboradores., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; e I. Stamenkovic e colaboradores, EMBO J. 8: 1403, 1989) e foi considerado como um elemento da família do receptor de TNF, a qual inclui receptores de NGF de baixa afinidade, receptores de TNF, CD27, OX40 e CD30. Ligantes (CD40Ls) a CD40s humano e de murino foram recentemente clonados e descobriu-se serem proteínas da membrana do tipo II e expressos em células T CD4+ ativadas. Descobriu-se também que o CD40L introduz fortes sinais para ativação em células B humanas ou de murino.

Em células dendríticas, foi observado que o CD40 é mais altamente expresso do que em células B e se tornou claro que o CD40 exerce um papel importante em células dendríticas. A ligação do CD40 ao CD40L ativa células apresentando antígeno (APCs), isto é expressa moléculas co-estimulatórias, tais como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), ou intensifica a produção de IL-2 (Caux, C. e colaboradores.: Activation of human dendritic cells

through CD40 cross-linking. J. Exp. Med., 180: 1263, 1994; e Shu, U. et al.: Activated T cells induce interleukin-12 production by monocyte via CD40 - CD40 ligand interaction. Eur. J. Immunol., 25: 1125, 1995). Células dendríticas têm uma forte capacidade de apresentação de antígeno e uma forte capacidade de ativar células T auxiliares (Th). Também, acredita-se que células dendríticas controlem a diferenciação de células Th naive em células Th1 ou Th2. Quando monócitos do sangue periférico, os quais são células dendríticas mielóides, são cultivados na presença de GM-CSF e IL-4 e amadurecidas pelo CD40L, as células dendríticas maduras resultantes (DC1) podem produzir IL-12 *in vitro* e estimular e ativar células Th naive alogenéticas para induzir as células T a produzirem IFN γ (isto é, promover sua diferenciação em Th1). Essa ação é inibida pelo anticorpo anti-IL-12 e, conseqüentemente, pode ser realizada via IL-12. Por outro lado, quando células T plasmacitóides, as quais estão presentes em regiões T linfóides e sangue periférico, são cultivadas na presença de IL-3 e ligante de CD40, foi mostrado que as células dendríticas linfóides resultantes (DC2) são incapazes de produzir IL-12 e estimular e ativar células Th naive alogenéticas ativas para induzir as células T a produzirem IL-4, o que indica promoção de sua diferenciação em Th2. Acredita-se que as células Th1 estão envolvidas na ativação de imunidade celular enquanto que as células Th2 estão associadas à intensificação de imunidade humoral, bem como restrição de imunidade celular. Quando células T citotóxicas (CTL) são ativadas com o auxílio de células Th1 elas podem eliminar patógenos (uma série de tipos de vírus, listérias, bactérias de tuberculose, protozoários de toxoplasma etc.) desenvolvidos no citoplasma e células tumorígenas.

Foi demonstrado que anticorpos anti-CD40 monoclonais, os quais reconhecem o CD40 expresso sobre a superfície da membrana, têm diferentes atividades biológicas às células B. Anticorpos anti-CD40 monoclonais são, geralmente, classificados em anticorpos agonistas ou antagonistas contra a interação entre o CD40 e CD40L.

2. Anticorpos Agonistas

Anticorpos agonistas são conhecidos por ativar células B. Por

exemplo, foi reportado que anticorpos anti-CD40 induzem à adesão celular (Barrett et al., J. Immunol. 146: 1722, 1991; e Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1998), aumentam o tamanho das células (Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1998; e Valle et al. Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989), induzem à

5 divisão celular de células B ativadas apenas por um anticorpo anti-IgM, anticorpo anti-CD20 ou éster de forbol (Clark e Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; Gordon et al., LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford. p.426; e Paulie et al., J. Immunol. 142: 590, 1989), induzem à expressão celular de IgE por células cul-

10 tivadas estimuladas com IL-4 e privadas de células T (Jabara et al., J. Exp. Med. 172: 1861, 1990; e Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991), induzem à expressão de IgG e IgM por aquelas células cultivadas (Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991), secretam CD23/FcεRII solúvel sobre células via IL4 (Challa, A., Allergy, 54: 576, 1999) e promovem a produção de IL-6 (Clark e

15 Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990). Além disso, é reportado que a adição de IL-4 e um anticorpo anti-CD40 a células B humanas em cultura primária na presença de células adesivas CDw32 + leva ao estabelecimento de células B clonadas derivadas das mesmas (Bancherauet et al., Science 241: 70, 1991) e a apoptose de células centrais germinais foi inibida pelo CD40, a

20 despeito se o receptor do antígeno era ativo ou inativo (Liu et al., Nature 342: 929, 1989). Conforme descrito acima, o CD40 foi identificado como um antígeno expresso sobre a superfície de células B humanas e, conseqüentemente, a maioria dos anticorpos isolados foi avaliada, como um índice, principalmente usando sua potência de indução para proliferação e/ou dife-

25 renciação de células B humanas ou sua atividade de indução de morte celular de células cancerígenas (Katira, A. et al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossmann et al eds. p.547. Oxford University Press. Oxford; W. C. Flansow et al, LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossossmann et al eds. p.555. Oxford University Press. Oxford; e J. D. Pound et al, International Im-

30 munology, 11: 11, 1999).

Foi demonstrado que o anticorpo anti-CD40 amadurece DC (Z. H. Zhou et al, Hybridoma, 18: 471, 1999). Além disso, o papel de células T

CD4 na produção de células T CD8 antígeno-específicas foi reportado na ativação de DC via sinalização de CD40 - CD40L e descobriu-se que o anticorpo monoclonal anti-CD40 (mAb) é capaz de substituir células T auxiliares CD40 na ativação de células dendríticas (DC) (Shoenberger, S. P. et al: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40 - CD40L interactions. Nature, 480, 1998). Também, descobriu-se que a administração de um anticorpo anti-CD40 a camundongos é capaz de proteger o corpo do animal de células tumorígenas expressando CD40, bem como células tumorígenas que não expressam CD40 (French, R. R. et al: CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma e bypasses T-cell help. Nature Medicine, 5, 1999).

Espera-se que anticorpos anti-CD40 agonistas sejam eficazes para o tratamento de doenças infecciosas em virtude de bactérias, vírus etc., câncer e outras, baseado em suas funções descritas no WO 02/088186. Os exemplos representativos desses anticorpos agonistas são anticorpos KM341-1-19 e 2105. O hibridoma KM341-1-19 que produz o anticorpo KM341-1-19 e o hibridoma 2105 que produz o anticorpo 2105 foram submetidos em 27 de setembro de 2001 e 17 de abril de 2002, respectivamente, para depósito internacional sob o Tratado de Budapeste, ao International Patent Organisms Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science e Technology (central 6, 1-1, Higashi 1, Tsukuba, Ibaraki, Japão). Seus números de acesso são FERM BP-7759 (KM341-1-19) e FERM BP-8024 (2105).

3. Anticorpos Antagonistas

Levando-se em consideração, por outro lado, que o CD40 exerce um papel importante em respostas imunológicas, conforme mencionado anteriormente, espera-se que a inibição de ligação do CD40 a seus ligantes leve ao desenvolvimento de agentes terapêuticos para supressão imune em transplante de órgãos e doenças auto-imunes. Sawada, Hase e outros reportaram que o sangue periférico de pacientes que sofrem de doença de Crohn têm um elevado percentual de monócitos que expressam, em alto grau, CD40. Contudo, tais anticorpos não são bem-conhecidos ainda como inibin-

do a ligação de CD40 a seus ligantes. Esses anticorpos inibitórios seriam úteis na análise funcional do CD40 e tratamento de doenças que requerem a ativação de CD40. Também é sugerido que anticorpos inibitórios dos ligantes de CD40 são eficazes contra doenças envolvendo a ligação de CD40 aos ligantes de CD40. Contudo, foi reportado que o CD40L é expresso em plaquetas ativadas (V. Henn et al., Nature 391: 591, 1998) e se um anticorpo anti-CD40L é usado como um agente terapêutico, formação de trombo pode ocorrer, segundo informações (T. Kawai et al., Nat. Med. 6: 114, 2000). Desse ponto de vista, espera-se que anticorpos ao CD40 sejam mais seguros do que anticorpos anti-CD40L como um agente terapêutico de anticorpo para inibir a ligação de CD40 a seus ligantes. Seria requerido que anticorpos anti-CD40 inibam a ligação de CD40L ao CD40 e ainda assim não ativem o CD40 em si.

Tais anticorpos anti-CD40 antagonistas podem ser usados para o tratamento de doenças auto-imunes e supressão de rejeições imunológicas em transplante de órgãos, medula óssea, etc., em vista de suas funções descritas acima. Anticorpos anti-CD40 com atividades antagonistas superiores são descritos no WO 02/088186. O exemplo representativo desses anticorpos antagonistas é o anticorpo 4D11. O hibridoma 4D11 que produz o anticorpo 4D11 foi submetido, em 27 de setembro de 2001, para depósito internacional sob o Tratado de Budapeste, ao International Patent Organisms Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science e Technology (central 6, 1-1, Higashi 1, Tsukuba, Ibaraki, Japão). O número de acesso é FERM BP-7758.

Documento de Patente 1 WO 02/088186

Descrição da Invenção

O objetivo da presente invenção é criar mutantes dos anticorpos anti-CD40 potencialmente terapêuticos descritos no WO 02/088186, mutantes os quais são projetados otimamente como agente farmacêutico.

Como um resultado de pesquisa extensiva e intensiva, os presentes inventores criaram com sucesso novos mutantes dos anticorpos agonistas e antagonistas, mutantes os quais podem ter um efeito terapêutico

superior contra doenças do que anticorpos anti-CD40 conhecidos e terminaram a presente invenção baseado nisso. A idéia básica sobre a modificação dos anticorpos anti-CD40 de acordo com a presente invenção será descrita em detalhes abaixo.

5 O presente relatório descritivo abrangerá a descrição no relatório descritivo e/ou desenhos da Publicação de Patente JP (Kokai) Nº 2003-431408, a qual é a base para a prioridade do presente pedido.

Breve Descrição dos Desenhos

10 A Figura 1A-1 mostra peptídeos de sítio de ligação preparados baseado na seqüência do CD40, aos quais os anticorpos anti-CD40 agonistas se ligam;

A Figura 1A-2 mostra peptídeos de sítio de ligação preparados baseado na seqüência do CD40, aos quais os anticorpos anti-CD40 agonistas se ligam (uma continuação da Figura 1A-1);

15 A Figura 1B-1 mostra peptídeos de sítio de ligação preparados baseado na seqüência do CD40, aos quais os anticorpos anti-CD40 antagonistas se ligam;

A Figura 1B-2 mostra peptídeos de sítio de ligação preparados baseado na seqüência do CD40, aos quais os anticorpos anti-CD40 antagonistas se ligam (uma continuação da Figura 1B-1);

20 A Figura 2A ilustra a ligação dos anticorpos anti-CD40 ao mutante de CD40;

A Figura 2B ilustra a ligação dos anticorpos anti-CD40 ao mutante de CD40;

25 A Figura 2C ilustra a ligação dos anticorpos anti-CD40 ao mutante de CD40;

A Figura 3A mostra diagramas indicando que o anticorpo KM341-1-19 tendo uma mutação P331S é ativo como o anticorpo KM341-1-19 original com relação à ligação a células Ramos;

30 A Figura 3B mostra diagramas indicando que o anticorpo KM341-1-19 tendo uma mutação P331S é ativo como o anticorpo KM341-1-19 original com relação à intensificação de expressão de CD95 em células

Ramos;

A Figura 4A mostra um diagrama indicando que o anticorpo KM341-1-19 tendo uma mutação P331S tem uma menor atividade de CDC via o complemento de coelho;

5

A Figura 4B mostra um diagrama indicando que o anticorpo G2/4 tem uma menor atividade de complemento quando o complemento humano é usado;

10 A Figura 5A-1 mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo 2105 de IgG2 em subclasses diferentes não tem efeito sobre sua ligação à células Ramos;

A Figura 5A-2 mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo KM341-1-19 de IgG2 em subclasses diferentes não tem efeito sobre sua ligação à células Ramos;

15 A Figura 5B-1 mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo 2105 de IgG2 em subclasses diferentes não tem efeito sobre sua ligação à células Ramos;

A Figura 5B-2 mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo KM341-1-19 de IgG2 em subclasses diminui a atividade para intensificar a expressão de CD95 em células Ramos;

20 A Figura 6A-1 mostra diagramas indicando que a capacidade de ligação dos anticorpos KM341-1-19 a células Ramos é independente de variação da região de dobradiça;

25 A Figura 6A-2 mostra diagramas indicando que a capacidade de ligação dos anticorpos 2105 a células Ramos é independente de variação da região de dobradiça;

A Figura 6B-1 mostra diagramas indicando que as dobradiças superior e mediana da região de dobradiça são importantes para a atividade dos anticorpos KM341-1-19 para intensificar a expressão de CD95 em células Ramos;

30 A Figura 6B-2 mostra diagramas indicando que as dobradiças superior e mediana da região de dobradiça são importantes para a atividade dos anticorpos 2105 para intensificar a expressão de CD95 em células Ra-

mos;

A Figura 7A mostra diagramas indicando que conversão da subclasse do anticorpo F72 a IgG2 não tem efeito sobre sua ligação a células Ramos;

5 A Figura 7B mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo F72 a IgG2 eleva a atividade para intensificar a expressão de CD95 em células Ramos;

10 A Figura 8A mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo 4D11 de IgG1 em IgG3 não tem efeito sobre sua ligação a células Ramos;

A Figura 8B mostra diagramas indicando que a conversão da subclasse do anticorpo 4D11 de IgG1 em IgG3 inibe a intensificação, pelo ligante CD40L, de expressão de CD95 em células Ramos, ao mesmo ponto que qualquer outro;

15 A Figura 9 mostra um diagrama indicando que a conversão da subclasse do anticorpo 4D11 de IgG1 para IgG4 ou IgG4PE diminui a atividade de CDC;

20 A Figura 10 mostra um diagrama indicando que a conversão da subclasse do anticorpo 4D11 de IgG1 para IgG4P diminui a atividade de CDC;

A Figura 11 ilustra uma variação no número de células B no sangue (células B220-positivas, dentre os linfócitos de sangue periférico) ao longo do tempo após 4D11G1, 4D11G4P ou 4D11G4PE ser administrado em camundongos CD40 humano-transgênicos;

25 A Figura 12A ilustra uma maior expressão de CD23 de células B esplênicas (células CD23-positivas, dentre as células B esplênicas) após cada anticorpo anti-CD40 ser administrado em camundongos CD40 humano-transgênicos;

30 A Figura 12B ilustra uma maior expressão de CD86 de células B esplênicas (células CD86-positivas, dentre as células B esplênicas) após cada anticorpo anti-CD40 ser administrado em camundongos CD40 humano-transgênicos;

A Figura 12C ilustra uma maior expressão de CD95 de células B esplênicas (células CD95-positivas, dentre as células B esplênicas) após cada anticorpo anti-CD40 ser administrado em camundongos CD40 humano-transgênicos;

5 A Figura 13A ilustra a atividade supressiva de produção do anticorpo antígeno-específico por (IgG1) por 4D11 e 281-1-10 em camundongos CD40 humano-transgênicos;

A Figura 13B ilustra a atividade supressiva de produção do anticorpo antígeno-específico (IgM) por 4D11 e 281-1-10 em camundongos
10 CD40 humano-transgênicos;

A Figura 14A ilustra os números de células B no sangue (células B220-positivas, dentre os linfócitos de sangue periférico) durante o ensaio de supressão de atividade que produz anticorpo antígeno-específico;

A Figura 14B ilustra os números de células B esplênicas (células
15 B220-positivas, dentre os linfócitos esplênicos) durante o ensaio de supressão de atividade que produz anticorpo antígeno-específico;

A Figura 15 ilustra uma variação no número de células B no sangue (células B220-positivas, dentre os linfócitos de sangue periférico) ao longo do tempo após 4D11G4P ou 4D11G4PE ser administrado em uma
20 dose de 30 mg/kg em macacos "cynomolgus";

A Figura 16 ilustra os níveis de IL-12 no sangue durante o ensaio mostrado na Figura 15;

A Figura 17 mostra o efeito supressivo de 4D11G4PE sobre a DTH em símios (hipersensibilidade do tipo retardada em macacos cynomolgus machos);
25

A Figura 18 mostra as titulações de IgG antitoxina do tétano durante o ensaio com os resultados mostrados na Figura 17;

A Figura 19 mostra as titulações de IgM antitoxina do tétano durante o ensaio com os resultados mostrados na Figura 17;

30 A Figura 20A ilustra as respectivas influências de 4D11G4PE e 5C8 (anticorpo antiligante de CD40) sobre a agregação plaquetária;

A Figura 20B mostra as respectivas influências de 4D11G4PE e

5C8 (anticorpo antiligante de CD40) sobre a agregação plaquetária;

A Figura 21 ilustra uma variação no teor de oligômeros de 4D11G4P, 4D11G4PE, 4D11G2Ser ou 4D11G4/2/4 ao longo do tempo após eles serem incubados em um pH de 2,7 e 37 °C;

5 A Figura 22 ilustra a supressão de rejeição de enxertos de pele pelo anticorpo anti-CD40 antagonista;

A Figura 23 ilustra a alteração de volume do tumor ao longo do tempo a partir de implante de células, em um caso onde 341G2Ser foi administrado a camundongos trazendo tumor com células Ramos implantadas nos mesmos;

10 A Figura 24 ilustra a alteração de volume do tumor ao longo do tempo a partir de implante de células, em um caso onde 341G2Ser foi administrado a camundongos trazendo tumor com células T24 implantadas nos mesmos;

15 A Figura 25 ilustra alteração de volume do tumor ao longo do tempo a partir de implante de células, em um caso onde 341G2Ser foi administrado a camundongos trazendo tumor com células Hs 766T implantadas nos mesmos; e

20 A Figura 26 ilustra alteração de volume do tumor ao longo do tempo a partir de implante de células, em um caso onde 341G2Ser foi administrado a camundongos trazendo tumor com células Capan-2 implantadas nos mesmos.

Melhor Modo para Realização da Invenção

1. Modificação de Anticorpos Agonistas

25 Anticorpos são essencialmente moléculas que funcionam para proteger corpos vivos contra corpos estranhos, tais como microorganismos e vírus, e câncer e, conseqüentemente, eles podem matar e eliminar tais células que se ligam aos mesmos. A atividade letal é composta de duas atividades diferentes, denominada Citotoxicidade Celular Anticorpo-Dependente

30 (abreviado como ADCC aqui depois) e Citotoxicidade Complemento-Dependente (abreviado como CDC aqui depois).

ADCC refere-se a um tipo de citotoxicidade induzida pela ativa-

- ção de macrófagos, células NK, células de neutrófilos, etc., as quais reconhecem células alvo através de ligação à região constante do anticorpo via receptores Fc expressos sobre sua superfície. Em contraste, CDC refere-se a um tipo de citotoxicidade induzida pela ativação de um sistema de complemento a qual ocorre através de ligação de um anticorpo a um antígeno. Essas atividades são conhecidas por variar, dependendo de uma subclasse do anticorpo, a qual descobriu-se ser em virtude de uma diferença estrutural na região constante dos anticorpos (Charles A. Janeway et al., Immunology, 1997, Current Biology Ltda./Garl e Publishing Inc.).
- Anticorpos anti-CD40 agonistas serão mais preferíveis como agente terapêutico se eles não têm atividades de ADCC e/ou CDC, as quais podem induzir à morte celular de células que expressam CD40, em termos de mecanismo de ação imunoativa. Se células que expressam CD40 são lesadas por atividades de ADCC e/ou CDC, imunossupressão pode ocorrer ao invés da imunoativação desejada, resultando em exacerbação da doença. Além disso, pacientes sofrendo de doenças infecciosas podem ter maiores atividades de ADCC e/ou CDC. Portanto, quando tais anticorpos são aplicados à doenças infecciosas, é necessário avaliar os mesmos com relação à segurança mais cuidadosamente, por exemplo, usando complementos de coelho mais ativos do que aqueles presentes no soro ou sangue periférico humano saudável, os quais não poderiam ser eficazes para detectar as atividades acima nessa situação. Conseqüentemente, mutantes e recombinantes foram criados os quais não têm atividade de ADCC ou CDC e sua atividade examinada.
- Uma vez que as atividades de ADCC e/ou CDC são conhecidas por variar dependendo de uma subclasse do anticorpo de interesse, conversão da subclasse pode reduzir as atividades de ADCC e/ou CDC. Para as subclasses de IgG humana, por exemplo, a IgG4 é conhecida, geralmente, como sendo uma subclasse com baixas atividades de ADCC e CDC e é reportado que a IgG2 é CDC-ativa, mas baixamente ativa quanto à ADCC, enquanto que a IgG1 é altamente ativa em ADCC e CDC (Charles A. Janeway et al., Immunology, 1997, Current Biology Ltda./Garl e Publishing Inc.). A

seleção de uma subclasse em particular tomando vantagem das características acima pode criar um anticorpo menos citotóxicos a partir do anticorpo original. Uma combinação de uma subclasse específica de anticorpo com tal ponto de mutação, conforme descrito abaixo, pode criar um anticorpo com uma atividade desejada. Ainda, redução nas atividades de ADCC e/ou CDC de um anticorpo é reportadas como estando associada à incorporação de uma mutação em sua região constante. Por exemplo, L235, D265, D270, K322, P331 e P329 (cada letra alfabética denota um aminoácido por notação com uma única letra e cada número denota um índice EU proposto por Kabat et al (Kabat et al, Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Quinta edição); tais símbolos serão usados aqui depois), podem exercer um papel importante na ativação de complemento pela IgG humana e substituição de um desses sítios por outro aminoácido pode reduzir a atividade de CDC. Esohe E. Idusogie et al J. Immunol. 2000, 164: 4178-4184, Yuanyuan Xu et al J. Biol. Chem. 1994, 269: 3469-3474, Brekke, O. H. et al Eur. J. Immunol. 1994, 24: 2542, Morgan, A., et al, Immunology 1995, 86: 319, Lund, J. et al, J. Immunol., 1996, 157: 4963, Tao, M. H., et al, J. Exp. Med. 1993, 178: 661). Substituição específica de D270, K322, P329 ou P331 por A pode reduzir a atividade de CDC. Substituição de P331 por S ou G também induz à mesma coisa.

Acredita-se que Glu233-Ser239, Gly316-Lys338, Lys274-Arg301, Tyr407-Arg416, Asn297, Glu318, Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 e Ala327-Ile332 tomem parte na ligação de IgG a FcR (Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R. e Winter, G. (1988) Nature 332, 563-564, Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A. e Schmidt, R. E. (1998) Ann. Hematol. 76, 231-248, Gavin, A., Hulett, M e Hogarth, P. M. (1998) em The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity (van de Winkel, J. G. J. e Hogarth, P. M., eds), páginas 11-35, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, Países Baixos, Sautes, C. (1997) em Cell-mediated Effects of Immunoglobulins (Fridman, W. H. e Sautes, C., eds), páginas 29-66, R. G. Landes Co., Austin, TX, Da'ron, M. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 203-234, Canfield, S. M. e Morri-

217

son, S. L. (1991) J. Exp. Med. 173, 1483-1491, Chappel, M. S., Isenman, D. E., Everett, M., Xu, Y.-Y., Dorrington, K. J. e Klein, M. H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 9036-9040, Woof, J. M., Partridge, L. J., Jefferis, R. e Burton, D. R. (1986) Mol. Immunol. 23, 319-330, Wines, B. D., Powell, M. S.,
5 Parren, P. W. H. I., Barnes, N. e Hogarth, P. M. (2000) J. Immunol. 164, 5313-5318) e, assim, a incorporação de uma mutação em uma dessas regiões pode reduzir a atividade de ADCC. Especificamente, a substituição de L235 por E ou G237 por A pode reduzir a ligação de IgG a FcR.

O anticorpo de acordo com a presente invenção tem pelo menos
10 uma mutação de aminoácidos para reduzir as atividades de ADCC e/ou CDC, de preferência 1-20, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, ou 1 ou 2 mutações.

A presente invenção revelou que, em alguns anticorpos anti-CD40, a região de dobradiça de IgG2 é importante na expressão de suas
15 fortes atividades agonistas. Espera-se que a substituição da região variável ou da região constante, exceto a região de dobradiça, por uma contraparte de qualquer subclasse diferentes ou a incorporação de um ponto de mutação na mesma não apenas module as atividades de ADCC e/ou CDC, mas aumente a produtividade do anticorpo, sua estabilidade durante purificação e
20 armazenamento e sua cinética no sangue.

Para produzir uma droga de anticorpo, a estabilidade do anticorpo durante purificação e armazenamento é muito importante. Uma vez que os anticorpos até hoje desenvolvidos pertencem principalmente à subclasse IgG1, a conversão da região variável ou da região constante, exceto a região
25 de dobradiça, a uma sequência derivada da subclasse IgG1 também será eficaz para melhorar as propriedades físicas dos anticorpos anti-CD40 agonistas descritos aqui.

A presente invenção proporciona mutantes de anticorpos anti-CD40 agonistas e outros como segue:

30 [1] uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal tendo uma atividade agonista, o qual se liga ao CD40, em que a cadeia pesada compreende uma dobradiça superior e uma dobradiça mediana derivada de uma

IgG2 humana e uma região constante com pelo menos um aminoácido deletado ou substituído ou com pelo menos um aminoácido adicionado à mesma, a referida deleção, substituição ou adição sendo capaz de aumentar ou diminuir a ADCC e/ou CDC.

5 [2] A cadeia pesada de acordo com [1], em que a região constante é derivada de uma IgG humana.

[3] A cadeia pesada de acordo com [2], em que a IgG humana é uma IgG1 humana.

10 [4] A cadeia pesada de acordo com [2], em que a IgG humana é uma IgG2 humana.

[5] A cadeia pesada de acordo com [2], em que a IgG humana é uma IgG3 humana.

[6] A cadeia pesada de acordo com [2], em que a IgG humana é uma IgG4 humana.

15 [7] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [3] a [5], em que a referida substituição de aminoácidos na região constante é substituição de prolina por serina na posição 331, a qual é indicada pelo índice EU conforme em Kabat et al.

20 [8] Um anticorpo monoclonal compreendendo a cadeia pesada de acordo com qualquer um de [1] a [7].

[9] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [1] a [7], em que a cadeia pesada compreende uma região variável de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma KM341-1-19 (Nº de Acesso FERM BP-7759).

25 [10] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [9] e uma cadeia leve compreendendo uma região variável de uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma KM341-1-19 (No. de Acesso FERM BP-7759).

30 [11] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [1] a [7], em que a cadeia pesada compreende uma região variável do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 38.

[12] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesa-

da de acordo com [11] e uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal, em que a cadeia leve compreende uma região variável do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 40.

5 [13] A cadeia pesada de acordo com [1], em que a cadeia pesada consiste em uma porção restante proporcionada através de remoção da sequência sinalizadora do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 132.

[14] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [13] e uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal, em que a cadeia leve consiste em uma porção restante proporcionada através de remoção da sequência sinalizadora do polipeptídeo representado por
10 SEQ ID NO: 134.

[15] A cadeia pesada de acordo com [1], em que a cadeia pesada é produzida por um hospedeiro compreendendo um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 131.

15 [16] O anticorpo monoclonal de acordo com [8], em que o anticorpo monoclonal é produzido por um hospedeiro compreendendo um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 131 e o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 133.

[17] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [1] a [7],
20 em que a cadeia pesada compreende uma região variável de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 2105 (No. de Acesso FERM BP-8024).

[18] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [17] e uma cadeia leve compreendendo uma região variável de uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 2105 (No. de Acesso FERM BP-8024).
25

[19] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [1] a [7], em que a cadeia pesada compreende uma região variável do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 42.

30 [20] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [19] e uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal, em que a cadeia leve compreende uma região variável do polipeptídeo repre-

sentado por SEQ ID NO: 44.

[21] A cadeia pesada de acordo com [1], em que a cadeia pesada consiste em uma porção restante proporcionada através de remoção da sequência sinalizadora do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 136.

5 [22] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [21] e uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal, em que a cadeia leve consiste em uma porção restante proporcionada através de remoção da sequência sinalizadora do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 138.

10 [23] A cadeia pesada de acordo com [1], em que a cadeia pesada é produzida por um hospedeiro compreendendo um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 135.

[24] O anticorpo monoclonal de acordo com [8], em que o anticorpo monoclonal é produzido por um hospedeiro compreendendo um vetor
15 de expressão tendo o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 135 e o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 137.

[25] Um polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 131.

[26] Um polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 133.

[27] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo de acordo
20 com [25].

[28] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo de acordo com [26].

[29] Um vetor de expressão tendo os polinucleotídeos de acordo com [25] e [26].

25 [30] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de acordo com [27].

[31] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de acordo com [28].

[32] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de
30 acordo com [29].

[33] Um processo de produção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal, compreendendo as etapas de: cultura do hospedeiro

de acordo com [30] em um meio de cultura; e obtenção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal da cultura e/ou do hospedeiro.

[34] Um processo de produção de um anticorpo monoclonal, compreendendo as etapas de: cultura do hospedeiro de acordo com [32] em
5 um meio de cultura; e obtenção de um anticorpo monoclonal da cultura e/ou do hospedeiro.

[35] Um polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 135.

[36] Um polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 137.

[37] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo de acordo
10 com [35].

[38] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo de acordo com [36].

[39] Um vetor de expressão tendo os polinucleotídeos de acordo com [35] e [36].

[40] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de
15 acordo com [37].

[41] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de acordo com [38].

[42] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de
20 acordo com [39].

[43] Um processo de produção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal, compreendendo as etapas de: cultura do hospedeiro de acordo com [40] em um meio de cultura; e obtenção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal da cultura e/ou do hospedeiro.

[44] Um processo de produção de a um anticorpo monoclonal, compreendendo as etapas de: cultura do hospedeiro de acordo com [42] em um meio de cultura; e obtenção de um anticorpo monoclonal da cultura e/ou do hospedeiro.
25

[45] Um processo de produção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal tendo uma atividade agonista capaz de ligação a CD40, compreendendo a etapa de substituição da dobradiça superior e da dobradiça mediana de um anticorpo, a qual não é uma dobradiça superior ou
30

uma dobradiça mediana derivada de uma IgG2 humana, por uma dobradiça superior e a dobradiça mediana derivada de uma IgG2 humana, respectivamente.

5 [46] Um processo de produção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal compreendendo uma região variável e uma dobradiça superior e uma dobradiça mediana derivada de uma IgG2 humana, compreendendo a etapa de identificação de um polipeptídeo que forma a região variável, a qual é de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal capaz de ligação a CD40.

10 [47] Um processo de produção de um anticorpo monoclonal tendo uma atividade agonista capaz de ligação a CD40, compreendendo a etapa de substituição da dobradiça superior e da dobradiça mediana de um anticorpo, a qual não é uma dobradiça superior ou uma dobradiça mediana derivada de uma IgG2 humana, por uma dobradiça superior e a dobradiça mediana derivada de uma IgG2 humana, respectivamente.

15 [48] Um processo de produção de um anticorpo monoclonal compreendendo uma região variável e uma dobradiça superior e uma dobradiça mediana derivada de uma IgG2 humana, compreendendo a etapa de identificação de um polipeptídeo que forma a região variável, a qual é de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal capaz de ligação a CD40.

20 [49] Uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com [8], [10], [12], [14], [16], [18], [20], [22] ou [24] como um ingrediente ativo.

25 [50] A composição farmacêutica de acordo com [49] usada para prevenção ou tratamento de um tumor maligno, um patógeno ou uma doença auto-imune.

[51] Um método de prevenção ou tratamento de um tumor maligno, um patógeno ou uma doença auto-imune, compreendendo administração de uma composição farmacêutica de acordo com [49] a um mamífero.

30 [52] Uso do anticorpo monoclonal de acordo com [8], [10], [12], [14], [16], [18], [20], [22] ou [24] para a produção de uma composição farmacêutica usada para prevenção ou tratamento de um tumor maligno, um pató-

223

geno ou uma doença auto-imune.

[89] Um polinucleotídeo proporcionado através de remoção da porção que codifica a sequência sinalizadora do polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 131.

5 [90] Um polinucleotídeo proporcionado através de remoção da porção que codifica a sequência sinalizadora do polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 133.

[91] Um polinucleotídeo proporcionado através de remoção da porção que codifica a sequência sinalizadora do polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 135.

10 [92] Um polinucleotídeo proporcionado através de remoção da porção que codifica a sequência sinalizadora do polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 137.

A presente invenção proporciona um anticorpo produzido através de modificação de um anticorpo anti-CD40 agonista pertencendo a uma IgG2 humana, em que o anticorpo modificado é um mutante tendo uma região constante, exclusiva das dobradiças superior e mediana, substituída por uma sequência derivada de uma subclasse diferente. A subclasse é, de preferência, IgG1. A presente invenção proporciona um anticorpo produzido através de modificação de um anticorpo anti-CD40 agonista pertencendo a uma IgG2 humana, em que o anticorpo modificado é um mutante tendo uma região constante, exclusiva da região de dobradiça, substituída por uma sequência derivada de uma subclasse diferente. A subclasse é, de preferência, IgG1.

25 Aqui, redução nas atividades de ADCC e CDC significa redução nessas atividades comparado às atividades correspondentes de um outro anticorpo monoclonal anti-CD40 que não os mutantes descritos acima, por exemplo, quando comparado às atividades correspondentes de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma KM341-1-19 (Nº de Acesso FERM BP-7759) ou 2105 (Nº de Acesso FERM BP-8024). As atividades de ADCC e CDC podem ser avaliadas através de qualquer método conhecido, por exemplo, o método descrito nos Exemplos aqui. As sequências das regi-

ões variáveis nas cadeias leve e pesada de um anticorpo monoclonal serão apresentadas abaixo, o qual é produzido pelo hibridoma KM341-1-19 (Nº de Acesso FERM BP-7759) ou 2105 (Nº de Acesso FERM BP-8024).

5 O DNA que codifica as regiões variáveis nas cadeias leve e pesada do anticorpo KM341-1-19 e as seqüências de aminoácidos das cadeias leve e pesada serão apresentadas abaixo.

Em uma seqüência de nucleotídeos de cadeia pesada (SEQ ID NO: 37) do anticorpo KM341-1-19, a seqüência sinalizadora é iniciada com adenina (A) na posição 50. O limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizada entre a "adenina" ([A]) na posição 109 e citosina (C) na posição 110 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre a adenina (A) na posição 493 e guanina (G) na posição 494 (o software de previsão do gene (Signal P ver.2) foi usado).

Em uma seqüência de aminoácidos de cadeia pesada (SEQ ID NO: 38) do anticorpo KM341-1-19, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizada entre a serina (S) na posição 20 e glutamina (Q) na posição 21 e o limite entre uma região variável e uma região constante está localizada entre a serina (S) na posição 148 e alanina (A) na posição 149.

20 Conseqüentemente, uma região variável em uma cadeia pesada do anticorpo KM341-1-19 tem uma seqüência de nucleotídeo oscilando de citosina (C) na posição 110 a adenina (A) na posição 493, conforme observado em SEQ ID NO: 37. Ainda, a região variável em uma cadeia pesada do anticorpo KM341-1-19 tem uma seqüência de aminoácido oscilando de glutamina (Q) na posição 21 a serina (S) na posição 148, conforme observado em SEQ ID NO: 38.

Em uma seqüência de nucleotídeos de cadeia leve (SEQ ID NO: 39), do anticorpo KM341-1-19, a seqüência sinalizadora é iniciada com adenina (A) na posição 29. O limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizada entre a "adenina" ([A]) na posição 88 e guanina (G) na posição 89 e o limite entre a região variável e a região constante está localizada entre a adenina (A) na posição 400 e "citosina" ([C]) na posição 401

(o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Em uma seqüência de aminoácidos de cadeia leve (SEQ ID NO: 40) do anticorpo KM341-1-19, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizada entre a glicina (G) na posição 20 e ácido glutâmico (E) na posição 21 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre a lisina (K) na posição 124 e "arginina" ([R]) na posição 125.

Conseqüentemente, uma região variável em uma cadeia leve do anticorpo KM341-1-19 tem uma seqüência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 89 a adenina (A) na posição 400, conforme observado em SEQ ID NO: 39. Ainda, a região variável na cadeia leve do anticorpo KM341-1-19 tem uma seqüência de aminoácidos oscilando de ácido glutâmico (E) na posição 21 a lisina (K) na posição 124, conforme observado em SEQ ID NO: 40.

A seqüência de nucleotídeos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 37) do anticorpo KM341-1-19:

GTCGACGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGCCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTT
CCTGCCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGTGCTCTGTACAGGTCCAACTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGT
GAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTACTTG
20 GAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGA
TCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTGAATAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACAGTTCTCCCT
GCAGCTGAACTCTGTGACTCCCAGGACACGGCTATATATTACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGA
TTACCCCTACTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
25 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACAC
CTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGCTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT
CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCG
CAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC
AAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
30 AGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGA
GGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGG

226

GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCT
 GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 CAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCAGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
 CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
 5 GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCC

A seqüência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 38)
 do anticorpo KM341-1-19:

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLQVQLQQSGPLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGR
 TYYRSKWYRDYVGSVKSRRIINPDTSNNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQLGGDYPIYYSMDEVWGQGTTV
 10 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
 KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 A seqüência de nucleotídeos da cadeia leve (SEQ ID NO: 39) do
 anticorpo KM341-1-19:

ACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCT
 CCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGC
 CACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC
 20 TCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
 TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCG
 TAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACG

A seqüência de aminoácidos da cadeia leve (SEQ ID NO: 40) do
 anticorpo KM341-1-19:

25 MEAPAQLLFLLLLWLPDFTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQQRNTFGPGTKVDIKRT

O DNA que codifica as regiões variáveis nas cadeias pesada e
 leve do anticorpo 2105 e as seqüências de aminoácidos das cadeias leve e
 pesada serão apresentadas abaixo.

30 Em uma seqüência de nucleotídeos da cadeia pesada (SEQ ID
 NO: 41) do anticorpo 2105, a seqüência sinalizadora é iniciada com adenina
 (A) na posição 70. O limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável

está localizado entre "timina" ([T]) na posição 126 e guanina (G) na posição 127 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre adenina (A) na posição 495 e guanina (G) na posição 496 (o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

5 Em uma seqüência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 42) do anticorpo 2105, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizado entre a cisteína (C) na posição 19 e ácido glutâmico (E) na posição 20 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre a serina (S) na posição 142 e alanina (A) na posição 143.

10 Conseqüentemente, a região variável na cadeia pesada do anticorpo 2105 tem uma seqüência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 127 a adenina (A) na posição 495, conforme observado em SEQ ID NO: 41. Ainda, a região variável na cadeia pesada do anticorpo 2105 tem uma seqüência de aminoácidos oscilando do ácido glutâmico (E) na posição 20 a serina (S) na posição 142, conforme observado em SEQ ID NO: 42.

15 Na seqüência de nucleotídeos da cadeia leve (SEQ ID NO: 43) do anticorpo 2105, a seqüência sinalizadora é iniciada com adenina (A) na posição 28. O limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizado entre "adenina" ([A]) na posição 87 e guanina (G) na posição 88 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre adenina (A) na posição 405 e "citosina" ([C]) na posição 406 (o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

20 Na seqüência de aminoácidos da cadeia leve (SEQ ID NO: 44) do anticorpo 2105, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizado entre glicina (G) na posição 20 e ácido glutâmico (E) na posição 21 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre lisina (K) na posição 126 e "arginina" ([R]) na posição 127.

25 Conseqüentemente, a região variável na cadeia leve do anticorpo 2105 tem uma seqüência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 88 a adenina (A) na posição 405, conforme observado em SEQ ID NO: 43. Ainda, a região variável na cadeia leve do anticorpo 2105 tem uma seqüência de aminoácidos oscilando de ácido glutâmico (E) na posição 21 a

30

lisina (K) na posição 126, conforme observado em SEQ ID NO: 44.

A seqüência de nucleotídeos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 41) do anticorpo 2105:

5 CTGAACACAGACCCGTCGACTCCCAGGTGTTTCCATTTCAGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATG
GAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAG
TCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGAT
GATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAAT
AGTGGTAGCTTGGTGCATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC
CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTT
10 CGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCAC
AAGG

A seqüência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 42) do anticorpo 2105:

15 MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
NSGSLVHADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFRGVRYYGMDVWGQGTITVTVSSAS
TK

A seqüência de nucleotídeos da cadeia leve (SEQ ID NO: 43) do anticorpo 2105:

20 CTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTC
CCAGATACCACCGAGAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCT
CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGAGTTTATTACTGTCAGCAGCGT
AGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTG

25 A seqüência de aminoácidos da cadeia leve (SEQ ID NO: 44) do anticorpo 2105:

MEAPAQLLELLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPAREFSGSGSTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTV

30 Na seqüência de nucleotídeos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 131) de 341G2Ser, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizado entre "adenina" ([A]) na posição 60 e citosina (C) na posição 61 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado en-

tre adenina (A) na posição 444 e guanina (G) na posição 445 (o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Na seqüência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 132) de 341G2Ser, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizado entre serina (S) na posição 20 e glutamina (Q) na posição 21 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre serina (S) na posição 148 e alanina (A) na posição 149.

Conseqüentemente, a região variável na cadeia pesada de 341G2Ser tem uma seqüência de nucleotídeos oscilando de citosina (C) na posição 61 a adenina (A) na posição 444, conforme observado em SEQ ID NO: 131. Ainda, a região variável na cadeia pesada de 341G2Ser tem uma seqüência de aminoácidos oscilando de glutamina (Q) na posição 21 a serina (S) na posição 148, conforme observado em SEQ ID NO: 132.

A seqüência de nucleotídeos de cadeia pesada inteira de 341G2Ser (SEQ ID NO: 131):

ATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGTGTCCTGTACAGGTCCAACTG
CAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGT
GTCTCTAGCAACAGTGCTACTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGACCTTGAGTGCGTGGGAAGG
ACATACTACAGGTCCAAGTGGTATCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTGAATAATCATCAACCCAGAC
ACATCCAACAACAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACA
AGAGCACAGTGCGTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTC
ACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG
AGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGC
GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC
AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGA
CCGTGAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCGGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCTCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG

GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- 5 A seqüência de aminoácidos de cadeia pesada inteira de
 341G2Ser (SEQ ID NO: 132):

MSVSFLIFLPVLGLPWGLSVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGR
 TYYRSKWYRDYVGSVKSRIIINPDTSNNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTTV
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSNFGTQTITCNVDHKPSNTKVDKTVVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 10 VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIE
 KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 15 Na seqüência de nucleotídeos de cadeia leve (SEQ ID NO: 133)
 de 341G2Ser, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está
 localizado entre "adenina" ([A]) na posição 60 e guanina (G) na posição 61 e
 o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre a-
 denina (A) na posição 372 e "citosina" ([C]) na posição 373 (o software de
 previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

- 20 Na seqüência de aminoácidos de cadeia leve (SEQ ID NO: 134)
 de 341G2Ser, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está
 localizado entre glicina (G) na posição 20 e ácido glutâmico (E) na posição
 21 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado en-
 tre lisina (K) na posição 124 e "arginina" ([R]) na posição 125. Conseqüen-
 temente, a região variável na cadeia leve de 341G2Ser tem uma seqüência
 25 de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 61 a adenina (A) na
 posição 372, conforme observado em SEQ ID NO: 133. Ainda, a região vari-
 ável na cadeia leve de 341G2Ser tem uma seqüência de aminoácidos osci-
 lando de ácido glutâmico (E) na posição 21 a lisina (K) na posição 124, con-
 forme observado em SEQ ID NO: 134.

- 30 A seqüência de nucleotídeos de cadeia leve inteira de 341G2Ser
 (SEQ ID NO: 133):

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTG

ACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT
 GTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
 AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGAGCAGCGTAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAA
 5 GTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
 GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGAT
 AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
 AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA

10 A sequência de aminoácidos de cadeia leve inteira de 341G2Ser
 (SEQ ID NO: 134):

MEAPAQLLFLLLLWLPDPTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRNTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
 GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
 15 GLSSPVTKSFNRGEC

Na sequência de nucleotídeos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 135) de 2105G2Ser, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre "timina" ([T]) na posição 57 e guanina (G) na posição 58 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre adenina (A) na posição 426 e guanina (G) na posição 427 (o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Na sequência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 136) de 2105G2Ser, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre cisteína (C) na posição 19 e ácido glutâmico (E) na posição 20 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre serina (S) na posição 142 e alanina (A) na posição 143.

Conseqüentemente, a região variável na cadeia pesada de 2105G2Ser tem uma sequência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 58 a adenina (A) na posição 426, conforme observado em SEQ ID NO: 135. Ainda, a região variável na cadeia pesada de 2105G2Ser tem uma sequência de aminoácidos oscilando de ácido glutâmico (E) na posição 20 a serina (S) na posição 142, conforme observado em SEQ ID NO: 136.

A sequência de nucleotídeos de cadeia pesada inteira de
2105G2Ser (SEQ ID NO: 135):

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT
5 GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTIGG
AATAGTGGTAGCTTGGTGCATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTA
TTTCGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGC
10 TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGCGGTG
CACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC
AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT
GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
15 CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCA
CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTTGTGCACCAGGACTGGCTGAAC
GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCGGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
20 GAGAACAATAACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC
GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

A sequência de aminoácidos de cadeia pesada inteira de
2105G2Ser (SEQ ID NO: 136):

25 MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
NSGSLVHADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFGRVRYGMDVWGQGTITVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPFPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTIKST
30 KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGSSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Na sequência de nucleotídeos da cadeia leve (SEQ ID NO: 137)

de 2105G2Ser, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre "adenina" ([A]) na posição 60 e guanina (G) na posição 61 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre adenina (A) na posição 378 e "citosina" ([C]) na posição 379 (o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Na sequência de aminoácidos de cadeia leve (SEQ ID NO: 138) de 2105G2Ser, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre glicina (G) na posição 20 e ácido glutâmico (E) na posição 21 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre lisina (K) na posição 126 e "arginina" ([R]) na posição 127. Consequentemente, a região variável na cadeia leve de 2105G2Ser tem uma sequência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 61 a adenina (A) na posição 378, conforme observado em SEQ ID NO: 137. Ainda, a região variável na cadeia leve de 2105G2Ser tem uma sequência de aminoácidos oscilando de ácido glutâmico (E) na posição 21 a lisina (K) na posição 126, conforme observado em SEQ ID NO: 138.

A sequência de nucleotídeos de cadeia leve inteira de 2105G2Ser (SEQ ID NO: 137):

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTG
 20 ACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT
 GTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
 AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTTCGGCGGGGGG
 ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
 25 AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
 AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACC
 CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

A sequência de aminoácidos de cadeia leve inteira de 2105G2Ser (SEQ ID NO: 138):

MEAPAQLLEFLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSTDFLTITISLEPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL

KSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT

HQGLSSPVTKSFNRGEC

2. Modificação de Anticorpos Antagonistas

Anticorpos anti-CD40 antagonistas serão mais preferíveis como o agente terapêutico, bem como anticorpos agonistas, se eles não têm as atividades de ADCC e/ou CDC, em termos de mecanismo de ação. Além disso, é importante que anticorpos anti-CD40 antagonistas não tenham atividade para induzir sinais por sua ligação reticulada *in vivo* via receptores Fc, mesmo se a atividade de ADCC não pode ser detectada. Em outras palavras, é necessário confirmar que eles não ativam a imunidade e tais anticorpos ativos podem ser desejados como um agente farmacêutico. Anticorpos anti-CD40 antagonistas são promissores como agentes terapêuticos para o tratamento de doenças auto-imunes ou supressão de rejeição a transplante de órgãos. Se eles induzem a uma atividade agonista em virtude de algum efeito após eles serem administrados aos pacientes, contudo, por mais fracos que sejam, os sintomas podem piorar em contraste ao efeito terapêutico desejado. Assim, um anticorpo sem qualquer atividade agonista é mais preferível como agente farmacêutico. Na presente invenção, foi demonstrado que a incorporação de um ponto de mutação L235E (significa substituição de L na posição 235 por E; símbolos similares serão usados aqui depois) em IgG4 é eficaz para a redução *in vivo* da atividade agonista, no teste com animais usando macacos. Embora a IgG4 seja uma subclasse com baixas atividades de ADCC e CDC, é reportado que quando se tentou expressar IgG4 como uma proteína recombinante em células tais como CHO, suas meias-moléculas foram secretadas em virtude de uma baixa ligação S-S entre as cadeias pesadas (Rob C. Aalberse et al., Immunology, 105, 9-19, 2002). Para superar esse problema, é reportado que a incorporação de uma mutação na região constante dos anticorpos promove com sucesso a formação da ligação S-S. Portanto, esse tipo de mutação também foi avaliado quanto à sua utilidade. Especificamente, a mutação da substituição de S na posição 228 por P foi incorporada (S. Angal et al., Molecular Immunology, vol. 30, nº 1, 105-108, 1993).

Para anticorpos antagonistas, bem como anticorpos agonistas, a estabilidade do anticorpo durante purificação e armazenamento é muito importante. Existem alguns métodos para criar tais anticorpos, uma vez que eles são fisicamente melhores, ao mesmo tempo em que mantêm a atividade antagonista. Os produtos farmacêuticos de anticorpo até hoje comercialmente oferecidos pertencem principalmente à subclasse IgG1 e não foi reportado que eles são problemáticos quanto à formulação farmacêutica. Baseado nesses fatos, pode ser vantajoso, do ponto de vista das propriedades físicas, derivar a região constante de anticorpos de IgG1. No caso de anticorpos anti-CD40, contudo, eles são, desejavelmente, menores quanto às atividades de ADCC e CDC. Como uma consequência, anticorpos tendo uma região constante do tipo IgG1 modificados com algumas mutações por pontos podem ser desejados. As mutações descritas acima são úteis para criar tais anticorpos. A região constante do tipo IgG1 pode se tornar menor quanto às atividades de ADCC e CDC através de incorporação do ponto de mutação P331G na mesma. Também é observado que a incorporação do ponto de mutação L235E em IgG4 elimina uma atividade levemente agonista *in vivo* para torná-la mais farmacologicamente ativa, mas a torna fisicamente menos estável em um baixo pH. Assim, a substituição de L235 por um outro aminoácido que não E pode torná-la mais fisicamente funcional. Com relação ao anticorpo 4D11, ele é muito similar ao anticorpo 2B11 com relação à estrutura de sua região variável. O anticorpo 2B11 tem uma menor atividade antagonista, mas tem uma maior estabilidade em um baixo pH, comparado ao anticorpo 4D11. Se alguns aminoácidos derivados da região constante de 2B11 são incorporados no anticorpo 4D11, baseado nas propriedades acima, o 4D11 pode se tornar mais estável. Especificamente, a ponto de mutação L38V, P58R, G62W, I79M, K81Y, H87Y, S98A, K109R, V120M ou T124A na cadeia pesada ou N75S na cadeia leve ou uma combinação das mesmas pode ser eficaz para essa finalidade. Especificamente, um mutante criado através de substituição de L na posição 38 na região variável de uma cadeia pesada do anticorpo 4D11 por V (abreviada como L38V; símbolos similares serão usados aqui depois), um mutante P58R, um mutante G62W,

um mutante I79M, um mutante, um mutante K81Y, um mutante H87Y, um mutante S98A, um mutante K109R, um mutante V120M ou um mutante T124A ou um mutante N75S na cadeia leve ou uma combinação dos mesmos pode ser proporcionada para essa finalidade.

- 5 O anticorpo de acordo com a presente invenção tem pelo menos uma mutação de aminoácidos para reduzir as atividades de ADCC e/ou CDC, de preferência 1-15, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 ou 1 ou 2 mutações.

- 10 A presente invenção proporciona mutantes de anticorpos anti-CD40 antagonistas e outros como segue:

- [53] A cadeia pesada de um anticorpo monoclonal tendo uma atividade antagonista capaz de ligação a CD40, em que a cadeia pesada compreende a região constante com pelo menos um aminoácido deletado ou substituído ou com pelo menos um aminoácido adicionado à mesma, a refe-
15 rida deleção, substituição ou seleção sendo capaz de aumentar ou diminuir a ADCC e/ou CDC.

[54] A cadeia pesada de acordo com [53], em que a região cons-
tante é derivada de uma IgG humana.

- [55] A cadeia pesada de acordo com [54], em que a IgG humana
20 é uma IgG1 humana.

[56] A cadeia pesada de acordo com [54], em que a IgG humana
é uma IgG2 humana.

[57] A cadeia pesada de acordo com [54], em que a IgG humana
é uma IgG3 humana.

- 25 [58] A cadeia pesada de acordo com [54], em que a IgG humana
é uma IgG4 humana.

- [59] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [55], [57]
ou [58], em que a referida substituição de aminoácidos na região constante é
substituição de leucina por ácido glutâmico na posição 235, a qual é indicada
30 pelo índice EU conforme em Kabat et al.

[60] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [53] a [58],
em que a cadeia pesada compreende a região constante com pelo menos

um aminoácido deletado ou substituído ou com pelo menos um aminoácido adicionado à mesma, a referida deleção, substituição ou adição sendo capaz de promover a formação da ligação S-S entre as cadeias pesadas.

5 [61] A cadeia pesada do anticorpo de acordo com [60], em que a referida substituição de aminoácidos na região constante é substituição de serina por prolina na posição 228, a qual é indicada pelo índice EU conforme em Kabat et al.

[62] Um anticorpo monoclonal compreendendo a cadeia pesada de acordo com qualquer um de [53] a [61].

10 [63] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [53] a [61], em que a cadeia pesada compreende uma região variável de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 4D11 (Nº de Acesso FERM BP-7758).

15 [64] Um anticorpo monoclonal compreendendo a cadeia pesada de acordo com [63] e uma cadeia leve compreendendo uma região variável de uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 4D11 (No. de Acesso FERM BP-7758).

20 [65] A cadeia pesada de acordo com qualquer um de [53] a [61], em que a cadeia pesada compreende uma região variável do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 46.

[66] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [65] e uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal, em que a cadeia leve compreende uma região variável do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 48.

25 [67] A cadeia pesada de acordo com [53], em que a cadeia pesada consiste em uma porção restante proporcionada através de remoção da sequência sinalizadora do polipeptídeo representado por SEQ ID NO: 140.

30 [68] Um anticorpo monoclonal consistindo em uma cadeia pesada de acordo com [67] e uma cadeia leve de um anticorpo monoclonal, em que a cadeia leve consiste em uma porção restante proporcionada através de remoção da sequência sinalizadora do polipeptídeo representado por

SEQ ID NO: 142.

[69] A cadeia pesada de acordo com [53], em que a cadeia pesada é produzida por um hospedeiro compreendendo um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 139.

5 [70] O anticorpo monoclonal de acordo com [62], em que o anticorpo monoclonal é produzida por um hospedeiro compreendendo um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 139 e o polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 141.

[71] Um polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 139.

10 [72] Um polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 141.

[73] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo de acordo com [71].

[74] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeo de acordo com [72].

15 [75] Um vetor de expressão tendo o polinucleotídeos de acordo com [71] e [72].

[76] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de acordo com [73].

20 [77] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de acordo com [74].

[78] Um hospedeiro compreendendo o vetor de expressão de acordo com [75].

25 [79] Um processo de produção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal, compreendendo as etapas de: cultura do hospedeiro de acordo com [76] em um meio de cultura; e obtenção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal da cultura e/ou o hospedeiro.

[80] Um processo de produção de um anticorpo monoclonal, compreendendo as etapas de: cultura do hospedeiro de acordo com [78] em um meio de cultura; e obtenção de um anticorpo monoclonal da cultura e/ou

30 o hospedeiro.

[81] Uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo monoclonal de acordo com [62], [64], [66], [68] ou [70] como um ingrediente

ativo.

[82] A composição farmacêutica de acordo com [81] usada para prevenção ou tratamento de rejeição a transplante, uma doença auto-imune, alergia ou inibição do Fator VIII de coagulação sangüínea.

5 [83] Um método de prevenção ou tratamento de rejeição a transplante, uma doença auto-imune, alergia ou inibição do Fator VIII de coagulação sangüínea, o qual compreende administração de uma composição farmacêutica de acordo com [81] a um mamífero.

10 [84] Uso do anticorpo monoclonal de acordo com [62], [64], [66], [68] ou [70] para a produção de uma composição farmacêutica usada para prevenção ou tratamento de rejeição a transplante, uma doença auto-imune, alergia ou inibição do Fator VIII de coagulação sangüínea.

15 [85] Um método de produção de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal tendo uma atividade antagonista capaz de ligação a CD40, em que a atividade agonista é diminuída, compreendendo uma etapa de seleção ou substituição de pelo menos um aminoácido ou adição de pelo menos um aminoácido na região constante de uma cadeia pesada de um anticorpo humano.

20 [86] O método de acordo com [85], em que a região constante é de uma IgG humana.

[87] O método de acordo com [86], em que a IgG humana é uma IgG4 humana.

25 [88] O método de acordo por qualquer um de [85] a [87], em que a referida substituição de aminoácidos na região constante é substituição de leucina por ácido glutâmico na posição 235, a qual é indicada pelo índice EU conforme em Kabat et al.

[93] Um polinucleotídeo proporcionada através de remoção da porção que codifica a seqüência sinalizadora do polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 139.

30 [94] Um polinucleotídeo proporcionada através de remoção da porção que codifica a seqüência sinalizadora do polinucleotídeo representado por SEQ ID NO: 141.

Adicionalmente, a presente invenção proporciona os materiais abaixo.

Um mutante de um anticorpo anti-CD40 antagonista compreendendo pelo menos uma substituição derivada do grupo consistindo em substituição de L por V na posição 38, substituição de P por R na posição 58, substituição de G por W na posição 62, substituição de I por M na posição 79, substituição de K por Y na posição 81, substituição de H por Y na posição 87, substituição de S por A na posição 98, substituição de K por R na posição 109, substituição de V por M na posição 120 e substituição de T por A na posição 124, substituições as quais são todas realizadas em uma região variável de uma cadeia pesada de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 4D11 (Nº de Acesso FERM BP-7758) e um mutante de um anticorpo anti-CD40 antagonista compreendendo substituição de N por S na posição 75 em uma região variável de uma cadeia leve do anticorpo 4D11.

Aqui, redução nas atividades de ADCC e CDC significa redução nessas atividade quando comparado com as atividades correspondentes de um outro anticorpo monoclonal anti-CD40 que não os mutantes descritos acima, por exemplo, quando comparado às atividades correspondentes de um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma 4D11 (No. de Acesso FERM BP-7758). As atividades de ADCC e CDC podem ser avaliadas através de qualquer método padrão, por exemplo, o método descrito nos Exemplos aqui. As seqüências das regiões variáveis nas cadeias pesada e leve de um anticorpo monoclonal serão apresentadas abaixo, o qual é produzido pelo hibridoma 4D11 (No. de Acesso FERM BP-7758).

O DNA que codifica as regiões variáveis nas cadeias pesada e leve do anticorpo 4D11 e as seqüências de aminoácidos das cadeias pesada e leve serão apresentadas abaixo, respectivamente.

Na seqüência de nucleotídeos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 45) do anticorpo 4D11, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável está localizado entre "citosina" ([C]) na posição 93 e citosina (C) na posição 94 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre adenina (A) na posição 456 e guanina (G) na posição 457 (o

software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Na sequência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 46) do anticorpo 4D11, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre serina (S) na posição 26 e glutamina (Q) na posição 27 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre serina (S) na posição 147 e alanina (A) na posição 148.

Conseqüentemente, a região variável na cadeia pesada do anticorpo 4D11 tem uma sequência de nucleotídeos oscilando de citosina (C) na posição 94 a adenina (A) na posição 456, conforme observado em SEQ ID NO: 45. Ainda, a região variável na cadeia pesada do anticorpo 4D11 tem uma sequência de aminoácidos oscilando de glutamina (Q) na posição 27 a serina (S) na posição 147, conforme observado em SEQ ID NO: 46.

Na sequência de nucleotídeos da cadeia leve (SEQ ID NO: 47) do anticorpo 4D11, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre "timina" ([T]) na posição 124 e guanina (G) na posição 125 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre adenina (A) na posição 442 e "citosina" ([C]) na posição 443 (o software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Na sequência de aminoácidos da cadeia leve (SEQ ID NO: 48) do anticorpo 4D11, o limite entre a sequência sinalizadora e a região variável está localizado entre citosina (C) na posição 22 e alanina (A) na posição 23 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre lisina (K) na posição 128 e "arginina" ([R]) na posição 129.

Conseqüentemente, a região variável na cadeia leve do anticorpo 4D11 tem uma sequência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na posição 125 a adenina (A) na posição 442, conforme observado em SEQ ID NO: 47. Ainda, a região variável na cadeia leve do anticorpo 4D11 tem uma sequência de aminoácidos oscilando de alanina (A) na posição 23 a lisina (K) na posição 128, conforme observado em SEQ ID NO: 48.

A sequência de nucleotídeos de cadeia pesada (SEQ ID NO: 45) do anticorpo 4D11:

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCG

GCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACC
 CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAG
 CCCCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTC
 AAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCC
 5 GCAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAG
 GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

A seqüência de aminoácidos da cadeia pesada (SEQ ID NO: 46)
 do anticorpo 4D11:

MDLMCKMKHLWFFLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKG
 10 LEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRVYFGWFDPWGQGTTLVT
 VSSAS

A seqüência de nucleotídeos de cadeia leve (SEQ ID NO: 47) do
 anticorpo 4D11:

AGATCTTAAGCAAGTGTAACTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGT
 15 CCCCCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTC
 TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG
 TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGGA
 AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGT
 20 GGAAATCAAACGTACG

A seqüência de aminoácidos de cadeia leve (SEQ ID NO: 48) do
 anticorpo 4D11:

MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYD
 ASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNSYPTFGQGTKVEIKRT

25 Na seqüência de nucleotídeos de cadeia pesada (SEQ ID NO:
 139) do anticorpo 4D11 G4PE, o limite entre a seqüência sinalizadora e a
 região variável está localizado entre "citosina" ([C]) na posição 78 e citosina
 (C) na posição 79 e o limite entre a região variável e a região constante está
 localizado entre adenina (A) na posição 441 e guanina (G) na posição 442 (o
 30 software de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

Na seqüência de aminoácidos de cadeia pesada (SEQ ID NO:
 140) do anticorpo 4D11, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região

variável está localizado entre serina (S) na posição 26 e glutamina (Q) na posição 27 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre serina (S) na posição 147 e alanina (A) na posição 148.

Conseqüentemente, a região variável na cadeia pesada do anticorpo 4D11 tem uma seqüência de nucleotídeos oscilando de citosina (C) na posição 79 a adenina (A) na posição 441, conforme observado em SEQ ID NO: 139. Ainda, a região variável na cadeia pesada do anticorpo 4D11 tem uma seqüência de aminoácidos oscilando de glutamina (Q) na posição 27 a serina (S) na posição 147, conforme observado em SEQ ID NO: 140.

10 A seqüência de nucleotídeos da cadeia pesada inteira (SEQ ID NO: 139) do 4D11G4PE:

ATGGATCTCATGTGCAAGAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTC
CTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGC
ACTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG
15 CTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC
ATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACGGCTGTG
TATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC
ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCC
20 CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGA
CCATCAGTCTTCTGTTCCTTCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
25 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTTG
CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCAGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
30 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

A seqüência de aminoácidos da cadeia pesada inteira (SEQ ID

NO: 140) do 4D11G4PE:

MDLMCKMKHLWFFLLLVAAAPRWLSQLQLQESGPGLLKPSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKG
LEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCTRPVVRYFCWFDPWGQGTTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
5 TVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAFEGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

Na seqüência de nucleotídeos da cadeia leve (SEQ ID NO: 141)
10 do 4D11G4PE, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável
está localizado entre "timina" ([T]) na posição 66 e guanina (G) na posição
67 e o limite entre a região variável e a região constante está localizado en-
tre adenina (A) na posição 384 e "citosina" ([C]) na posição 385 (o software
de previsão de gene (Signal P ver.2) foi usado).

15 Na seqüência de aminoácidos da cadeia leve (SEQ ID NO: 142)
do 4D11G4PE, o limite entre a seqüência sinalizadora e a região variável
está localizado entre citosina (C) na posição 22 e alanina (A) na posição 23
e o limite entre a região variável e a região constante está localizado entre
lisina (K) na posição 128 e "arginina" ([R]) na posição 129.

20 Conseqüentemente, a região variável na cadeia leve do
4D11G4PE tem uma seqüência de nucleotídeos oscilando de guanina (G) na
posição 67 a adenina (A) na posição 384, conforme observado em SEQ ID
NO: 141. Ainda, a região variável na cadeia leve do anticorpo 4D11 tem uma
seqüência de aminoácidos oscilando de alanina (A) na posição 23 a lisina
25 (K) na posição 128, conforme observado em SEQ ID NO: 142.

A seqüência de nucleotídeos de cadeia leve inteira (SEQ ID NO:
141) do 4D11G4PE:

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC
CACTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
30 CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT
GCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCAC
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTTCGGC

CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG
 CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
 TGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
 ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGTACGGTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
 5 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGTA

A seqüência de aminoácidos de cadeia leve inteira (SEQ ID NO: 142) do 4D11G4PE:

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYD
 ASNLESGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 10 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

3. Definição

Os termos usados aqui serão definidos abaixo.

"CD40", descrito na presente invenção, se refere a um polipeptídeo tendo a seqüência de aminoácidos descrita em E. A. Clark e colaboradores., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986 ou I. Stamenkovic e colaboradores., EMBO J. 8: 1403, 1989 e particularmente um polipeptídeo antígeno expresso sobre a superfície de células B, DC, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais ou células tumorígenas derivadas dos mesmos.
 20 mos.

"Um anticorpo anti-CD40" se refere a qualquer anticorpo monoclonal a um CD40 célula-expresso, um CD40 de comprimento total ou um CD40 de comprimento parcial.

Além disso, "um anticorpo" da invenção é derivado de genes (coletivamente denominados genes de anticorpo) que codificam uma região variável de cadeia pesada e uma região constante de cadeia pesada, bem como uma região variável de cadeia leve e uma região constante de cadeia leve as quais, juntas, constituem uma imunoglobulina. Imunoglobulinas humanas são agrupadas em 5 classes diferentes consistindo de IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Ainda, a IgG é composta de 4 subclasses diferentes, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, enquanto que a IgA é composta de 2 subclasses diferentes, terminada por suas cadeias H. O anticorpo de acordo com a presente inven-
 25
 30

ção pode compreender qualquer classe, qualquer subclasse ou qualquer isotipo de imunoglobulina. Um "fragmento funcional" do anticorpo da invenção refere-se a uma parte (fragmento parcial) do anticorpo definido acima que é ativa única ou multiplamente sobre um antígeno ao anticorpo incluindo, por exemplo, $F(ab')_2$, Fab' , Fab , Fv , FV dissulfeto-estabilizado, FV com cadeia simples ($scFV$) e um multímero dos mesmos (D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, 1998, T. J. International Ltda.).

Até o momento, descobriu-se que a $IgG1$ inclui J00228, Z17370 e Y14737, $IgG2$ inclui J00230, AJ250170, AF449616, AF449617, AF449618, Z49802 e Z49801, $IgG3$ inclui M12958, K01313, X16110, X99549, AJ390236, AJ390237, AJ390238, AJ390241, AJ390242, AJ390246, AJ390247, AJ390252, AJ390244, AJ390254, AJ390260, AJ390262, AJ390272, AJ390276 e AJ390279 e $IgG4$ inclui K01316, AJ001563 e AJ001564 (os símbolos listados acima indicam os números de acesso dos genes).

Na presente invenção, $CH1$, dobradiça, $CH2$ e $CH3$ denotam, cada um, uma parte da região constante de cadeia pesada de qualquer anticorpo e são baseados no índice EU, conforme em Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Quinta edição). Por definição, $CH1$ oscila de 118 a 215 pelo índice EU, dobradiça oscila de 216 a 230 pelo índice EU, $CH2$ oscila de 231 a 340 pelo índice EU e $CH3$ oscila de 341 a 446 pelo índice EU.

O "anticorpo humano" da presente invenção significa um anticorpo o qual é um produto de expressão de um gene de anticorpo humano-derivado.

"Agonista" refere-se a uma ação de intensificação de ligação de um ligante ao CD40 expresso sobre a superfície de células tais como células B, células tumorígenas ou células dendríticas ou a ação de proporcionar a células que expressam CD40 pelo menos um efeito o qual o ligante de CD40 tem sobre células que expressam CD40. Um "anticorpo agonista" refere-se a um anticorpo tendo tal ação agonista. Um exemplo dos efeitos proporciona-

dos pelas células que expressam CD40 é promover a expressão de CD95.

"Antagonista" refere-se a uma ação de inibição da ligação do ligante ao CD40 expresso sobre a superfície de células tais como células B, células tumorigenas ou células dendríticas ou uma ação de neutralização de pelo menos um efeito o qual o ligante de CD40 tem sobre células expressando CD40. Um "anticorpo antagonista" refere-se a um anticorpo tendo tal ação antagonista. Um exemplo dos efeitos proporcionados por células que expressam CD40 é suprimir a proliferação de células B ou a produção de anticorpos.

O presente pedido apresenta claramente anticorpos ou regiões variáveis de cadeia pesada ou cadeia leve dos mesmos por seqüências de aminoácidos. A presente invenção também abrange as seqüências de aminoácidos com pelo menos um aminoácido deletado ou substituído ou adicionados às mesmas, de preferência 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 ou 1 ou 2 aminoácidos.

O presente pedido apresenta claramente genes os quais codificam anticorpos ou as regiões variáveis de cadeia pesada ou cadeia leve dos mesmos por seqüências de nucleotídeos. A presente invenção também abrange as seqüências de nucleotídeos com pelo menos um nucleotídeo deletado ou substituído ou adicionado às mesmas, de preferência 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 ou 1 ou 2 aminoácidos.

O anticorpo anti-CD40 de acordo com a presente invenção pode ser proporcionado através de incorporação de um gene de anticorpo em um vetor de expressão, transfecção do vetor em uma célula hospedeira desejada, coleta do anticorpo das células cultivadas ou do sobrenadante e purificação do mesmo.

O vetor pode ser um fago ou um plasmídeo o qual pode se replicar na célula hospedeira em si ou pode ser integrado no cromossoma da célula hospedeira. O DNA de plasmídeo pode ser derivado de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ou uma levedura, enquanto que o DNA de fago pode ser do λ fago.

A célula hospedeira para transformação não está particularmente

limitada se ela pode expressar o gene alvo. Exemplos da célula hospedeira podem incluir bactérias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), leveduras, células de animais (células COS, células CHO, etc.) e células de inseto.

Existem modos conhecidos para a transferência do gene para as
5 células hospedeiras, incluindo qualquer modo tal como mediação através de íons de cálcio, eletroporação, fusão por esferoplasta, mediação por acetato de lítio, transfecção com fosfato de cálcio ou lipofecção. De forma a transferir o gene para um animal, conforme descrito anteriormente, os modos incluem microinjeção, eletroporação ou lipofecção de células ES; e transplante nu-
10 clear.

Na presente invenção, "cultura" refere-se (a) ao sobrenadante de cultura, (b) às células cultivadas, biomassa cultivada ou matéria decomposta dos mesmos ou (c) à secreção do transformante. Para cultivar o transformante, um meio adequado para o hospedeiro é usado e cultura estática, cul-
15 tura em garrafa giratória ou qualquer outra coisa pode ser empregada.

Após a cultura, se a proteína de anticorpo desejada é produzida dentro da biomassa ou células, o anticorpo é coletado através de decomposição da biomassa ou das células. Se o anticorpo desejado é produzido fora da biomassa ou células, a solução de cultura é usada como está ou após ela
20 ser separada da biomassa ou células através de centrifugação ou outros meios. Após o que, um processo bioquímico utilizando qualquer cromatografia, a qual é apropriada para separação/purificação de proteínas, é empregada sozinha ou opcionalmente em combinação com outra para separar/isolar o anticorpo desejado da cultura.

25 Além disso, a tecnologia de criação de um animal transgênico pode ser usada para produzir um animal transgênico que é um animal hospedeiro tendo o gene integrado em um gene endógeno, tal como um bovino transgênico, um bezerro transgênico, uma ovelha transgênica ou um porco transgênico (Wright, G. et al., (1991) Bio/Technology 9, 830-834) e uma
30 grande quantidade de um anticorpo monoclonal derivado do gene de anticorpo pode ser obtida do leite secretado do animal transgênico. A cultura de um hibridoma *in vitro* pode ser feita através de uso de um meio nutriente co-

nhcido ou qualquer meio nutriente derivativamente preparado de meios básicos conhecidos, conforme usado para desenvolver, manter e armazenar o hibridoma e produzir um anticorpo monoclonal no sobrenadante, dependendo das propriedades do hibridoma cultivado, da finalidade do estudo e do método de cultura.

4. Propriedades do Anticorpo

(1) Anticorpos Agonistas

O mutante do anticorpo agonista de acordo com a presente invenção pode ativar o sistema imune sem lesar células imunocompetentes, uma vez que ele tem atividade de ADCC e/ou CDC igual a ou menor do que o anticorpo original, ao mesmo tempo em que mantém uma atividade agonista. Assim, espera-se que o mutante exiba a ação de imunoativação a qual é igual ou maior do que o anticorpo original e a citotoxicidade para células que expressam CD40 é igual a ou menor do que o anticorpo original.

(2) Anticorpos Antagonistas

O mutante do anticorpo anti-CD40 antagonista de acordo com a presente invenção tem a atividade de ADCC e/ou CDC reduzida comparado ao anticorpo não-modificado, ao mesmo tempo em que mantém uma atividade supressiva contra sinais de imunoativação induzidos pelo CD40L. Também espera-se que ele diminua a atividade da indução de sinal *in vivo* a qual é considerada como ocorrendo via receptores Fc.

5. Composições Farmacêuticas

Uma composição farmacêutica contendo uma formulação do anticorpo purificado de acordo com a presente invenção também está dentro do escopo da presente invenção. Uma composição farmacêutica pode, de preferência, conter um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável além do anticorpo e pode ser uma mistura dos mesmos com um anticorpo diferente ou uma droga diferente, tal como um agente antibiótico. O veículo adequado pode incluir, mas não está limitado a, solução salina fisiológica, solução salina fisiológica tamponada com fosfato, solução salina de glicose tamponada com fosfato e solução salina fisiológica tamponada. Alternativamente, o anticorpo pode ser liofilizado para armazenamento e, quando ele é u-

sado, reconstituído em um tampão aquoso conforme descrito acima. A composição farmacêutica pode ser administrada através da via oral ou da via parenteral, tal como através de dosagem ou injeção intravenosa, intramuscular, subcutânea ou intraperitoneal.

- 5 Uma única dose eficaz, a qual é uma combinação do anticorpo da presente invenção com um diluente adequado e um veículo fisiologicamente aceitável, é de 0,0001 mg a 100 mg por kg de peso corporal e pode ser tomada em qualquer intervalo de tempo de 2 dias a 8 semanas.

- 10 Quando uma composição farmacêutica do presente anticorpo é um anticorpo agonista, ele é usado como: imunoestimulante (agente antiviral ou antiinfecioso) para patógenos incluindo, por exemplo, hepatite pelos vírus A, B, C, D ou E, HIV, vírus da influenza, vírus do herpes simplex, citomegalovírus, vírus EB, vírus papiloma, clamídia, micoplasma, toxoplasma, malária, tripanossoma e bacilo da tuberculose; agente antitumor para tumores
- 15 malignos tendo células cancerígenas com CD40 expresso incluindo, por exemplo, câncer pancreático, câncer de bexiga, linfoma (por exemplo, linfoma de Hodgkin), leucemia, melanoma maligno, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer ovariano, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de cólon, câncer prostático e câncer de cabeça e pescoço; e agente terapêutico
- 20 para doenças auto-imunes, tal como reumatismo. A composição farmacêutica pode ser usada para uma combinação das doenças acima. Ela pode também ser usada em combinação como um adjuvante para um peptídeo câncer-específico. Quando a composição farmacêutica é um anticorpo antagonista, por outro lado, ela é útil como: imunossupressor em transplante de
- 25 órgãos (agente preventivo ou terapêutico para rejeição em transplante de ilhotas pancreáticas, rim ou outros ou GVHD), agente terapêutico para doenças auto-imunes (por exemplo, reumatismo, psoríase, colite ulcerativa crônica, doença de Crohn, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, miastenia, escleroderma, síndrome de anticorpos antifosfolipídios, hepatite auto-
- 30 imune, púrpura trombocitopênica idiopática, hepatite auto-imune, síndrome de Behcet, arteriosclerose, nefrite e síndrome de dificuldade respiratória), agente terapêutico para alergia (por exemplo, asma) e agente terapêutico

para inibição do Fator VIII de coagulação sangüínea. A composição farmacêutica pode ser usada para uma combinação das doenças acima.

6. Epítomos

Os epítomos de ligação do CD40 foram determinados para os anticorpos KM341-1-19 e 2105 tendo uma atividade agonista superior e para o anticorpo 4D11 tendo uma atividade antagonista superior, respectivamente (Exemplo 2). A presente invenção proporciona anticorpos tendo uma atividade agonista ou antagonista os quais têm uma seqüência de região variável diferente daquelas nos anticorpos acima, mas reconhecem o mesmo epítopo que um dos anticorpos acima. Esses anticorpos podem ser obtidos em um procedimento tal como descrito abaixo.

Quando se pretende adquirir um anticorpo anti-CD40 agonista que reconhece o mesmo epítopo que o anticorpo KM341-1-19, por exemplo, camundongos ou semelhante são imunizados com CD40 para proporcionar anticorpos monoclonais a partir dos quais alguns anticorpos monoclonais que competem com o anticorpo KM341-1-19 pela ligação ao CD40 são selecionados, de acordo com o procedimento padrão. A partir dos anticorpos selecionados, um anticorpo tendo o mesmo padrão de ligação a um peptídeo que o anticorpo KM341-1-19 é selecionado de acordo com o método descrito no Exemplo 2.

A presente invenção será descrita em maiores detalhes abaixo com referência aos exemplos. Contudo, a presente invenção não está limitada às modalidades descritas nos Exemplos.

Exemplo 1: Expressão e purificação de proteínas de anticorpo e antígeno

Um plasmídeo de vetor contendo uma região variável de um anticorpo foi transfectado em células CHO (ATCC) e células expressando anticorpo foram selecionadas por G418 para preparar uma linhagem de células de expressão estável.

Um antígeno mutante foi expresso através de introdução transitória de um vetor em células HEK (ATCC).

Um anticorpo anti-CD40 foi purificado do sobrenadante de cultura acima através do seguinte método. O sobrenadante de cultura contendo

um anticorpo anti-CD40 foi purificado por afinidade na coluna Hyper D Protein (fabricada pela Insulators, Ltda.) ou, no caso de purificação de IgG1 de camundongo, uma coluna de Proteína G (Amersham Pharmacia Biotech) de acordo com as instruções em anexo usando PBS(-) como um tampão de adsorção e um tampão de citrato de sódio a 0,1M (pH de 3) como um tampão de eluição. A fração eluída foi ajustada para um pH de cerca de 7,2 através da adição de uma solução de Tris-HCl (pH de 8,0) ou Na₂HPO₄. A solução de anticorpo preparada foi substituída por PBS(-) usando uma membrana de diálise (corte de 10.000, fabricada pela Spectrum Laboratories, Inc.) ou uma coluna SP (Amersham Pharmacia Biotech) e filtrada e esterilizada usando um filtro com membrana MILLEX-GV com um diâmetro de poro de 0,22 µm (fabricado pela Millipore Corp.). A concentração do anticorpo purificado foi calculada através de medição da absorbância a 280 nm, tomando 1 mg/ml como 1,450D.

15 Exemplo 2: Determinação dos epítomos

Um peptídeo de 13-mero abrangendo o aminoácido 175 (SEQ ID NO: 1) em uma região extracelular do CD40 foi desviado por dois aminoácidos, cada um, para sintetizar 82 peptídeos no total (SEQ ID NOs: 49 a 130) como pontos a partir do C-término sobre uma membrana de celulose e acetilar o N-término do mesmo (Jerini AG, Alemanha). A reação aqui depois foi realizada baseado em uma análise de Western convencional (veja Reineke, U. et al. (2001), "Epitope mapping with synthetic peptides prepared by SPOT synthesis." Antibody Engineering (Springer Lab Manual) Eds.: Kontermann/Dubel, 433-459, por exemplo). Na análise, a intensidade de cor de cada ponto foi quantificada usando Lumilmager® (Boehringer-Mannheim Corp.) (Figuras 1A-1, A-2, B-1 e B-2).

Os resultados confirmaram que um anticorpo 4D11 reconhece fortemente os 20° a 24° e 41° peptídeos, um anticorpo 2105 reconhece fortemente os 12° a 23° e 64° peptídeos, um anticorpo KM341-1-19 reconhece fortemente os 41° e 42° peptídeos, KM643-4-11 reconhece fortemente o 43° peptídeo, F72 reconhece fortemente o 75° peptídeo, 110 reconhece fortemente o 64° peptídeo, F4-465 reconhece fortemente os 34°, 35°, 54°, 55°,

65°, 66° e 75° peptídeos, KM281-1-10 reconhece fortemente os 21°, 24°, 64° e 75° peptídeos, 2B11 (novo anticorpo) reconhece fortemente os 21°, 24° e 64° peptídeos e F76 (novo anticorpo) reconhece fortemente os 21°, 35°, 51° e 52° peptídeos.

- 5 De forma a confirmar o sítio de ligação do anticorpo anti-CD40, uma proteína de fusão CD40-Fc tendo uma mutação introduzida na mesma foi preparada e a capacidade de ligação da mesma foi examinada através de ELISA. Uma vez que o anticorpo anti-CD40 não reage cruzadamente com células B de camundongo, cinco proteínas de fusão CD40Fc foram prepara-
- 10 das através de conversão parcial da sequência de aminoácidos para aquela de CD40 de camundongo. A ligação do anticorpo aos antígenos foi examinada. O método para preparação das proteínas de fusão CD40-Fc mutantes é mostrado abaixo. O sítio de mutação foi preparado através de introdução de uma sequência de CD40 de camundongo em uma parte da qual o anti-
- 15 corpo se liga fortemente à sequência peptídica. CD40mut1 converteu EFTE em um sítio correspondendo ao 15° peptídeo em ALEK, CD40mut2 converteu LDT em um sítio correspondendo ao 21° peptídeo em SAQ, CD40mut3 converteu TH em um sítio correspondendo ao 24° peptídeo em IR, CD40mut4 converteu EEGW em um sítio correspondendo ao 42° peptídeo
- 20 em KEGQ e CD40mut5 converteu VSSA em um sítio correspondendo ao 64° peptídeo em QSSL. Os mutantes foram preparados de acordo com uma técnica de manipulação de gene (Figuras 2A, B e C). Os resultados da análise confirmaram que o anticorpo 2105 tem capacidade de ligação extremamente reduzida ao CD40mut1. Os resultados também confirmaram que o anticorpo
- 25 4D11 e 2B11 têm capacidade de ligação reduzida ao CD40mut2.

Exemplo 3: Atividade de ligação de um anticorpo anti-CD40 agonista a células Ramos

- Uma linhagem de células Ramos foi suspensa no tampão de coloração de PBS (SB) contendo NaN_3 a 0,1% e 2% de FCS em uma concen-
- 30 tração de $2 \times 10^6/\text{ml}$. A suspensão de células (100 μl /cavidade) foi distribuída a uma lâmina de fundo redondo com 96 cavidades (fabricada pela Becton, Dickinson e Company). Cada sobrenadante de cultura de hibridoma (50 μl)

foi adicionado e incubado em uma temperatura gelada durante 30 minutos. Um anticorpo de IgG1 humano à albumina de soro humano como um controle negativo foi ajustada para uma concentração de 2 µg/ml no meio de cultura de hibridoma, adicionada em uma quantidade de 50 µl e, então, incubada em uma temperatura gelada durante 15 minutos. Após lavagem da lâmina com SB, 50 µl de um anticorpo anti-humano fluorescentemente rotulado com R-PE 250 vezes diluído (fabricado pela Southern Biotechnology Associates, Inc.) foram adicionados e incubados em uma temperatura gelada durante 15 minutos. Após lavagem da lâmina com SB duas vezes, ela foi suspensa em 300 a 500 µl de um tampão de FACS e a intensidade de fluorescência de cada célula foi medida usando FACS (FACSort, FACScan, fabricado pela Becton, Dickinson e Company).

Exemplo 4: Avaliação de atividade agonista de anticorpo anti-CD40 agonista a células Ramos

5,0 × 10⁵ células/ml de uma suspensão de células Ramos foram cultivadas sobre uma lamina com 96 cavidades a 100 µl/cavidade. O sobrenadante da cultura de hibridoma ou anticorpo purificado foi diluído para 20 µg/ml no meio e a diluição foi adicionada à lâmina com 96 cavidades em uma concentração de 100 µl/cavidade. Após cultura durante a noite, as células foram coletadas e anticorpo anti-CD95 rotulado com R-PE (Pharmingen NJ) foi usado para as células. Análise foi realizada usando FACScan ou FACSort (Becton, Dickinson e Company).

Exemplo 5: Inibição de expressão de CD95 por anticorpo anti-CD40 antagonista em células Ramos

1,0 × 10⁶ células/ml de uma suspensão de células Ramos foram cultivadas sobre uma lâmina com 96 cavidades a 50 µl/cavidade. O sobrenadante de cultura de hibridoma ou anticorpo purificado foram ajustados para 2 µg/ml no meio e o meio foi adicionado à lâmina com 96 cavidades a 100 µl/cavidade. 4 µg/ml de um ligante de CD40 solúvel (Alexis Corporation) e 4 µg/ml de um anticorpo anti-FLAG (M2, Sigma) foram adicionados ao meio e o meio foi adicionado a uma lâmina com 96 cavidades a 50 µl/cavidade. Após cultura durante a noite, as células foram coletadas e um anticorpo anti-

CD95 rotulado com R-PE (Pharmingen NJ) foi usado para as células. A análise foi realizada usando FACS.

Exemplo 6: Medição da atividade de CDC em um anticorpo anti-CD40

No ensaio de CDC, 2.000 células alvo Cr^{51} -rotuladas e um complemento derivado de soro humano (fabricado pela Sigma Co.) ou complemento desprovido de soro de coelho (Cedarlane Laboratories Limited, Ontário, Canadá) em uma concentração final de 5% foram cultivadas em uma lâmina com 96 cavidades de fundo redondo tendo um volume total de 200 μL junto com o anticorpo em várias concentrações a 37 °C na presença de 5% de CO_2 durante 2 horas.

Após cultura, a lâmina foi centrifugada para fazer com que as células se precipitassem e, então, 50 μL do sobrenadante foram transferidos para uma lâmina com 96 cavidades incluindo um cintilante em pó (Lumaplate®-96: fabricado pela Packard Instrument Co., Inc.) e uma dose de raios γ foi medida com um contador de cintilação (TopCount: fabricado pela Packard Instrument Co., Inc.).

Exemplo 7: Medição de atividade de ADCC do anticorpo anti-CD40

Como citotoxicidade anticorpo-mediada, a citotoxicidade para células alvo na presença de células tendo uma atividade assassina, tal como células NK ou neutrófilos, e um anticorpo (Citotoxicidade Celular Anticorpo-Dependente, aqui depois ADCC) e a citotoxicidade para células alvo na presença de um complemento e um anticorpo (Citotoxicidade Complemento-Dependente, aqui depois CDC) foram medidas. hIgG foi usada como um controle.

O método de medição é simplesmente descrito como segue. Cromo radioativo (Cr^{51}) foi incorporado no citoplasma das células alvo e a quantidade de Cr^{51} liberado da solução de cultura através de morte celular foi medida como uma dose de raios γ .

Especificamente, 10^5 células alvo de uma linhagem de células de linfoma de Burkitt Raji (ATCC CCL-86) foram suspensas em 15 μL de soro fetal de bezerro (FCS). 50 μL (37 MBq/mL) de cromiato de sódio Cr^{51} -rotulado (fabricado pela PerkinElmer, Inc.: aqui depois referido como Cr^{51})

foram adicionadas à suspensão e as células foram cultivadas a 37 °C durante uma hora. Em seguida, 10 mL de um meio foram adicionados e o meio foi descartado através de centrifugação. Essa operação foi repetida três vezes para remover o Cr- não incorporado nas células.

- 5 No ensaio de ADCC, 2.000 células alvo Cr⁵¹-rotuladas e 200.000 leucócitos mononucleares de sangue periférico humano saudável obtidos por meio do método descrito no Exemplo 6 foram cultivados em uma lâmina com 96 cavidades com fundo redondo (fabricada pela Falcon) em um volume total de 200 µL junto com o anticorpo em várias concentrações a 37 °C
- 10 na presença de 5% de CO₂ durante quatro horas.

- Após cultura, a lâmina foi centrifugada para fazer com que as células se precipitassem e, então, 50 µL do sobrenadante foram transferidos para uma lâmina com 96 cavidades incluindo um cintilante em pó (Lumaplate[®]-96: fabricado pela Packard Instrument Co., Inc.) e seca a 55°C durante
- 15 1,5 hora. Após confirmar que a lâmina estava seca, a lâmina foi coberta com uma cobertura especial (TopSeal[®]-A: microplacas de 96 cavidades: fabricado pela Packard Instrument Co., Inc.) e a dose de raios γ foi medida com um contador de cintilação (TopCount: fabricado pela Packard Instrument Co., Inc.).

- 20 Exemplo 8: Preparação e avaliação de atividade de um mutante P331S de anticorpo anti-CD40 agonista

- Clonagem de anticorpos anti-CD40 agonistas KM341-1-19 e 2105 é descrita no WO 02/099186. É reportado que a atividade de CDC é reduzida através de conversão de Pro na posição 331 da região constante de IgG2 em Ser. Para reduzir a atividade de CDC do anticorpo KM341-1-19
- 25 e do anticorpo 2105, uma mutação P331S foi introduzida na região constante IgG2 dos mesmos.

- Um vetor N5KG1-Val Lark expressando a região constante de IgG1 humana (IDEC Pharmaceuticals: aqui depois abreviado como N5KG1)
- 30 foi substituído por IgG2 humana para preparar N5KG2 e a Pro na posição 331 da IgG2 foi convertida em Ser para preparar uma mutação. Clonagem do cDNA da região constante da IgG2 foi realizada coletando-se o hibridoma

KM341-1-19 através de centrifugação, adicionando-se TRIZOL (Gibco BRL) e extraído-se o RNA total de acordo com a instrução. O cDNA de região variável do anticorpo foi clonado usando um kit de amplificação de cDNA SMART RACE da Clontech Laboratories, Inc. de acordo com a instrução em

5 anexo. 1ª fita e cDNA foram preparados usando 5 µg de RNA total como um modelo. PCR foi realizada com tnlG3Nhe: atatGCTAGCACCAAGGGCC-CATCGGTCTTCCCCCTGGC (SEQ ID NO: 2)G e tnlG2Bam: atatggatccT-CATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC (SEQ ID: 3) como seqüências de iniciador usando um kit ZtaqPCR (Takara) em 30 ciclos, cada um consistindo

10 em reação a 98 °C durante 1 segundo, a 55 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 1 minuto para amplificar o gene. Após a reação, o produto amplificado foi purificado através de um kit de purificação QIAGEN PCR, digerido com NheI e BamHI e incorporado em N5KG1 para confirmar a seqüência. Esse vetor foi definido como N5KG2.

15 N5KG2Ser (com Pro na posição 331 convertida em Ser) foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e os iniciadores IgG3Nhe: atatGCTAGCACCA-AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG (SEQ ID NO: 4) e G2Ser2:

20 GTTTTCTCGATGGAGGCTGGGAGGCC (SEQ ID NO: 5). Nesse momento, reação a 98 °C durante 1 minuto, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e os iniciadores IgG2Bam: atatggatccTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC (SEQ ID NO: 6) e G2Ser1: GGCCTCCCAGCCTCCATCGAGA-

25 AAAC (SEQ ID NO: 7). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação de PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores IgG3Nhe e IgG2Bam fo-

30 ram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1 (N5KG2Ser). O fragmento

contendo a sequência da região variável do anticorpo digerido com Bg1II e NheI foi incorporado no vetor N5KG2Ser.

O anticorpo expresso e purificado através do método acima foi avaliado em termos de capacidade de ligação à células Ramos (Figura 3A) e atividade agonista (Figura 3B). A flutuação na atividade em virtude da introdução da variação P331S não foi observada.

Exemplo 9: Medição da atividade de CDC de um mutante 331ser de anticorpo anti-CD40 agonista

A atividade de CDC foi medida por meio do método acima. Um complemento derivado de soro de coelho foi usado e células Ramos foram usadas como células alvo. Os resultados confirmaram que, no anticorpo KM341-1-19 em uma concentração de anticorpo de 1 µg/ml, IgG2ser exibiu atividade de CDC significativamente reduzida quando comparado à IgG2 (Figura 4A). Por outro lado, quando um suplemento humano foi usado, nenhuma alteração foi observada (Figura 4B).

Exemplo 10: Preparação e medição de atividade de anticorpo anti-CD40 agonista tendo uma região constante convertida

Entre os anticorpos anti-CD40 descritos no WO 02/088186, dois anticorpos exibindo atividade agonista mais forte (anticorpo KM341-1-19 e anticorpo 2105) pertencem à subclasse IgG2. De forma a examinar se a subclasse IgG2 é ou não importante para a ativação de CD40, proteínas recombinantes tendo uma região constante de anticorpo convertida em IgG1, IgG3 e IgG4, respectivamente, foram preparadas e medidas em termos de capacidade de ligação a um antígeno e a atividade de intensificação de expressão de CD95 em células Ramos de acordo com os Exemplos 4 e 6. IgG1 foi expressa usando N5KG1 e IgG2 e IgG3 foram, respectivamente, expressas usando os vetores de expressão N5KG2 e N5KG3 obtidos através de substituição da região constante de N5KG1 por IgG2 e IgG3, respectivamente. A clonagem do cDNA da região constante de IgG3 foi realizada de acordo com o método de clonagem de IgG2 parcialmente modificado, usando um iniciador IgG3-específico. IgG4 foi expressa usando N5KG4PE (IDEC Pharmaceuticals).

A proteína do anticorpo foi expressa de acordo com o Exemplo 1. A atividade de ligação à células Ramos expressando CD40 humano do anticorpo KM341-1-19 e o anticorpo 2105 não foi afetada pela conversão de IgG2 em IgG1, IgG3 ou IgG4 (Figuras 5A-1 e 5A-2). Isso mostra que não apenas a estrutura da região variável que define a região de ligação do anticorpo, mas também a estrutura da região constante do anticorpo são importantes para a forte atividade agonista, um mutante de domínio no qual a estrutura de IgG2 é misturada com a estrutura de IgG4 foi preparado para medir sua atividade. Conforme descrito acima, um mutante de domínio é preparado através de substituição de uma região de dobradiça. Nesse caso, a "região de dobradiça" inclui uma dobradiça superior (216, do código EU de Kabat), dobradiça mediana (226, do código EU de Kabat) e dobradiça inferior (231, código EU de Kabat), conforme descrito em Ole H Brekke et al, Immunology Today 1995, 16, 85-90. Quatro mutantes de domínio IgG2/4 (CH1 e região de dobradiça: IgG2, outras regiões: IgG4), IgG4/2/4 (região de dobradiça: IgG2, outras regiões: IgG4), IgG2/4/4 (CH1: IgG2, outras regiões: IgG4) e IgG4/2/2 (CH1: IgG4, outras regiões: IgG2) foram preparados, respectivamente, para o anticorpo KM341-1-19 e o anticorpo 2105.

Um vetor N5KG2/4 para expressão do anticorpo G2/4 foi preparado usando um kit Ztaq PCR (Takara). Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e iniciadores IgG3Bam: atatg-gatccTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC (SEQ ID NO: 8) e 24Chi4: AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGTCTT (SEQ ID NO: 9). Ao mesmo tempo, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG4 (IDEC Pharmaceuticals) como um modelo e iniciadores 24Chi3: AAGGACACTCT-CATGATCTCCCGGACCCCT (SEQ ID NO: 10) e linkH2: tgatcatacgtagatat-cacggc (SEQ ID NO: 11). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando o kit de purificação por PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30

segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores IgG3Bam e linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (SEQ ID NO: 12) foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do
5 vetor N5KG1.

Um vetor N5KG4/2/4 para expressão de IgG4/2/4 foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG4 como um modelo e iniciadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEQ ID
10 NO: 13), G2Hin3: TTTGCGCTCAACTGTCTTGTC-CACCTTGGTGTGCTGGG (SEQ ID NO: 14), linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (SEQ ID NO: 15) e G2Hin4: ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC-GAGTGCCCCACCG (SEQ ID NO: 16). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com um kit de purificação por PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o
15 que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes usando a mistura como um modelo. Os iniciadores linkH e linkH2 foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi
20 clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1.

Um vetor N5KG2/4/4 para expressão de IgG2/4/4 foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes usando N5KG2
25 como um modelo e iniciadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEQ ID NO: 17) e G4CH1-2: GGTGTTGCTGGGCTTGTGATCTACGTTGCAG (SEQ ID NO: 18). Ao mesmo tempo, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG4 como um modelo e iniciadores G4CH1-1: CTGCAACGTA-
30 GATCACAAGCCCAGCAACACC (SEQ ID NO: 19) e linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (SEQ ID NO: 20). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação por PCR e as mesmas quantidades dos

dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores linkH e linkH2 foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1.

Um vetor N5KG4/2/2 para expressão de IgG4/2/2 foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada usando N5KG4 como um modelo e iniciadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEQ ID NO: 21) e G4CH1-2: GGTGTTGCTGGGCTTGTGATCTACGTTGCAG (SEQ ID NO: 22). Ao mesmo tempo, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e iniciadores G4CH1-1: CTGCAACGTAGATCA-CAAGCCCAGCAACACC (SEQ ID NO: 23) e linkH2: tgatcatatcgtatgacggc (SEQ ID NO: 24). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação por PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores linkH e linkH2 foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1.

A atividade de ligação dos quatro respectivos mutantes de domínio do anticorpo KM341-1-19 e do anticorpo 2105 foram examinadas. Como um resultado, nenhuma diferença entre os mesmos o a IgG2 original foi observada em termos de capacidade de ligação (Figuras 6A-1 e 6A-2). Contudo, apenas IgG2/4/4 do anticorpo KM341-1-19 e do anticorpo 2105 exibiram atividade agonista significativamente reduzida (Figuras 6B-1 e 6B-2). Os resultados confirmaram que a região de dobradiça da IgG2 é importante para atividade agonista.

Ainda, foi examinado qual sequência é importante na região de

dobradiça. A região de dobradiça é dividida em três sítios, especificamente, dobradiça superior, dobradiça mediana e dobradiça inferior (Ole H Brekke et al. Immunology Today 1995, 16, 85-90). Sequências IgG2-específicas nessas regiões foram, respectivamente, substituídas por sequências IgG4-específicas. Anticorpos obtidos através de introdução de uma mutação em uma dobradiça superior (216, do código EU de Kabat), dobradiça mediana (226, do código EU de Kabat) e dobradiça inferior (231, do código EU de Kabat) foram, respectivamente, definidos como IgG2UH4, IgG2MH4 e IgG2LH4. Seus respectivos vetores de expressão foram definidos como N5KG2UH4, N5KG2MH4 e N5KG2LH4. "Dobradiça" é definida como índices EU 216 a 230, de acordo com Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Quinta edição.

N5KG2UH4 foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e iniciadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEQ ID NO: 25) e UH4-2: CACAACATTTggaCTCAACTcTCTTGTCCACC (SEQ ID NO: 26). Ao mesmo tempo, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e iniciadores UH4-1: GGTGGACAAGAgAGTTGAGtccAAATGTTGTG (SEQ ID NO: 27) e linkH2: tgatcatcacgtagatatcacggc (SEQ ID NO: 28). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação de PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores linkH e linkH2 foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1.

N5KG2MH4 foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo iniciadores linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (SEQ ID NO: 29) e UM4-2: GGCACGGTGGG-

CATgggggaccataTTTGCGCTC (SEQ ID NO: 30). Ao mesmo tempo, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e iniciadores UM4-1: GAGCGCAAAtatgtgtccccaTGCCCACCGTGCC (SEQ ID NO: 31) e linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (SEQ ID NO: 32). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação de PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores linkH e linkH2 foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1.

N5KG2LH4 foi preparado como segue. Reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo iniciadores linkH: ggg-tacgtcctcacattcagtgatcag (SEQ ID NO: 33) e UL4-2: GAAGACT-GACGGTCCccccaggaactcTGGTGCTGGGCA (SEQ ID NO: 34). Ao mesmo tempo, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada 15 vezes usando N5KG2 como um modelo e iniciadores UL4-1: TGCCCAGCACCAgagttcctggggGGACCGT-CAGTCTTC (SEQ ID NO: 35) e linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (SEQ ID NO: 36). Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados usando um kit de purificação de PCR e as mesmas quantidades dos dois fragmentos de DNA purificados foram misturadas. Após o que, reação a 98 °C durante 1 segundo, a 60 °C durante 30 segundos e a 72 °C durante 30 segundos foi realizada cinco vezes. Os iniciadores linkH e linkH2 foram adicionados à mistura e a mesma reação foi realizada 15 vezes. O fragmento de DNA amplificado foi clivado com NheI e BamHI e substituído pela região constante de IgG1 do vetor N5KG1.

Os três respectivos mutantes de domínio do anticorpo KM341-1-19 e do anticorpo 2105 foram examinados como tendo a mesma atividade de ligação ao antígeno (Figuras 6A-1 e 6A-2). Contudo, IgG2UH4 e

IgG2MH4 exibiram atividade agonista significativamente reduzida em células Ramos (Figuras 6B-1 e 6B-2). Descobriu-se, a partir do acima, que as estruturas da dobradiça superior e dobradiça mediana na região de dobradiça são importantes para a atividade agonista subclasse IgG2-dependente dos anticorpos anti-CD40 KM341-1-19 e 2105.

Uma vez que descobriu-se que a subclasse IgG2 era importante para atividade agonista, anticorpos de outra subclasse que não IgG2 foram convertidos àqueles da subclasse IgG2 para examinar se a atividade agonista era ou não intensificada. No exame de vários clones, a atividade agonista do F76 pôde ser intensificada através de conversão da subclasse IgG1 à subclasse IgG2 (Figuras 7A e B).

Exemplo 11: Preparação de mutantes de anticorpo anti-CD40 antagonistas

Um fragmento de DNA contendo a cadeia pesada e uma cadeia leve de um gene de anticorpo 4D11 descrito no WO 02/088186, cuja subclasse original é IgG1, foi digerido com Bg1II e NheI, purificado e, então, integrado nos vetores N5KG4PE, N5KG4P e N5KG4 (IDEC Pharmaceuticals). N5KG4PE contém pontos de mutações S228P e L235E na região constante de IgG4 e N5KG4P contém um ponto de mutação S228P na região constante da IgG4. A proteína de anticorpo foi expressa e purificada de acordo com o método acima. O anticorpo foi purificado de acordo com o método acima usando ligação a células Ramos como um índice. Alteração na atividade de ligação de IgG1, IgG4, IgG4P e IgG4PE a células Ramos não foi observada (Figura 8A). A atividade antagonista de IgG1 foi comparada com aquela de vários mutantes de IgG4 de acordo com o método acima para verificar que a atividade antagonista de IgG1 não difere daquela dos mutantes de IgG4 (Figura 8B).

Exemplo 12: Avaliação de atividade de ADCC e atividade de CDC de mutantes de anticorpo anti-CD40 antagonistas

A atividade de ADCC e atividade de CDC de anticorpos mutantes anti-CD40 foram avaliadas de acordo com o método acima.

Quando do uso de MNC humana como células efetadoras e células de Daudi que expressam CD40 como células alvo, dois mutantes,

IgG4 e IgG4PE, respectivamente, foram observados como tendo atividade de ADCC significativamente reduzida quando comparado com a IgG1 como a subclasse original do anticorpo 4D11 (Figura 9).

- 5 A atividade de CDC da IgG1 foi comparada com aquela da IgG4P usando células de Daudi como células alvo. Descobriu-se que a IgG4P tinha atividade de CDC significativamente reduzida quando comparado à IgG1 (Figura 10).

Exemplo 13: Efeito do anticorpo anti-CD40 antagonista sobre células B

- 10 100 µg de cada um de IgG1, IgG4P e IgG4PE do anticorpo 4D11 foram administrados à veia caudal de camundongos tendo uma base genética pelo que eles eram homozigóticos para CD40 decomposto endógeno de camundongo e abrigando um transgene de um gene de CD40 humano (Yasui et al. Int. Immunol. 2002 Vol 14: 319). 24 horas após a administração, sangue foi coletado do plexo venoso orbital. Após hemólise com 0,16 mol/L
- 15 de cloreto de amônio, um anticorpo anti-B220 FITC-rotulado foi adicionado ao hemolisato e foi analisado usando FACS. Os resultados não-mostrados na Figura 11. Na Figura, o eixo longitudinal indica a proporção de células B nos linfócitos totais. A IgG1 reduziu a proporção de células B ao máximo, a IgG4P reduziu a proporção em um ponto menor e IgG4PE reduziu a proporção em um ponto muito menor. 24 horas após a administração, o baço foi
- 20 removido e triturado com uma lâmina de vidro para preparar uma suspensão de células. Após hemólise da suspensão de células. Um anticorpo anti-B220 PE-rotulado e um anticorpo anti-CD23, CD86 ou CD95 FITC-rotulado foi usado para o hemolisato e foi analisado usando FACS. Os resultados são
- 25 mostrados nas Figuras 12A, B e C. Nas Figuras, o eixo longitudinal indica a proporção de células B expressando cada marcador da superfície nos linfócitos totais. Descobriu-se que o 4D11G1 obtém o mesmo nível de aumento na expressão de um marcador, conforme em um anticorpo anti-CD40 humano agonista de camundongo comercialmente disponível 5C3 (Pharmingen).
- 30 IgG4PE obteve um menor aumento na expressão de cada marcador de superfície de ativação quando comparado com IgG1 e IgG4P.

Exemplo 14: Efeito de produção de inibição de anticorpo antígeno-específico e alteração no número de células B causada por anticorpo anti-CD40 antagonista

100 μ g (baseado em NP-CGG) de um complexo de conjugados
5 de γ -globulina de galinha-4-hidróxi-3-nitrofenilacetila (NP-CGG: distribuído pelo Professor Hitoshi KIKUTANI, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University) e alume (gel de hidróxido de alumínio) foram intraperitonealmente administrados a camundongos tendo uma base genética pelo que eles eram homozigóticos para CD40 decomposta endógena de camundongo
10 e trazendo um transgene de um gene de CD40 humano (Yasui et al. Int. Immunol. 2002 Vol 14: 319) para sensibilizar os camundongos. Imediatamente antes de sensibilização com o antígeno, 50 ou 100 μ g de cada anticorpo foram administrados à veia caudal. 100 μ g de um anticorpo de IgG4PE anti-albumina humana foram administrados como um controle negativo. 7 e 14
15 dias após a sensibilização, sangue foi coletado do plexo venoso orbital. As quantidades de anticorpos de IgG1 e IgM NP-específicos no soro foram medidas pelo método ELISA. O método ELISA foi realizado como segue. 50 μ l/cavidade de albumina de soro bovino NP-ligada (NP-BSA: 2,5 μ g/ml) foram adicionados a cada cavidade de uma microlâmina com 96 cavidades
20 para ELISA (Maxisorp, fabricado pela Nunc S/A) e incubados a 4 °C para fazer com que o NP-BSA fosse adsorvido sobre as mesmas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e um reagente de bloqueio (SuperBlock, fabricado pela Pierce Biotechnology, Inc.) foi adicionado a cada cavidade e incubado em temperatura ambiente para realizar bloqueio. Então, cada cavidade
25 foi lavada com um tampão de fosfato (PBS-T) contendo 0,1% de Tween 20 três vezes. Em seguida, cada soro diluído com 10% de Block Ace (50 μ l/cavidade) foi adicionado a cada cavidade e incubado e reagido a 37 °C durante duas horas. A microlâmina foi lavada com PBS-T três vezes. Então, uma diluição a 1.000 vezes de um anticorpo anti-IgG1 de camundongo de
30 bezerro ou anticorpo IgM rotulado com fosfatase alcalina (Cosmo Bio, 1070-04 ou 1020-04) com PBS-T contendo 10% de Block Ace (50 μ g/cavidade) foi adicionado a cada cavidade e incubado a 37 °C durante duas horas. Em se-

guida, a microlâmina foi lavada com PBS-T e, então, uma solução de coloração de substrato (50 µl/cavidade, Sigma 104, substrato de fosfatase) foi adicionada a cada cavidade. A absorbância em um comprimento de onda de 405 nm foi medida usando um leitor para microlâmina. Os resultados são mostrados nas Figuras 13A e B. Nas Figuras, o eixo longitudinal indica os valores obtidos através de conversão de uma diluição a 10.000 vezes (no caso de IgG1) ou diluição de 100 vezes (no caso de anticorpo IgM) do soro coletado de camundongos C57BL/6, ao qual NP-CGG foi injetado duas vezes e empoçado em uma unidade. O anticorpo 4D11 e o anticorpo IgG4P ou IgG4PE de 281 inibiram a produção de anticorpos IgG1 e IgM NP-específicos de modo igualmente forte.

A alteração no número de células B no sangue periférico e baço nos camundongos usados para examinar o efeito de inibição da produção de anticorpo foi medida de acordo com o mesmo método conforme no Exemplo 1. Os resultados são mostrados nas Figuras 14A e B. O anticorpo 4D11 e o anticorpo IgG4P de 281 reduziram a proporção de células B no sangue periférico significativamente quando comparado ao anticorpo IgG4PE. A administração de 100 µg do anticorpo IgG4PE não alterou a proporção de células B no baço removido 14 dias após a sensibilização com o antígeno. Contudo, a administração de IgG4P alterou ou tendeu à alteração da proporção.

Exemplo 15: Efeito do anticorpo anti-CD40 antagonista sobre macacos cynomolgus

30 mg/kg de IgG4P ou IgG4PE de um anticorpo 4D11 foram administrados à veia cefálica do antebraço de macacos cynomolgus e sangue foi coletado da veia femoral após um determinado período de tempo. Na análise do subconjunto de linfócitos de sangue periférico, um anticorpo anti-CD3 FITC-rotulado anticorpo anti-CD20 PE-rotulado e anticorpo anti-CD45 APC-rotulado foram usados para cada suspensão de células e a proporção de células positivas foi medida usando FACS para calcular a proporção de células CD45 positivas. Os resultados são mostrados na Figura 15. Na Figura, o eixo longitudinal indica a proporção de células CD20 positivas em cada tempo para células CD20 positivas antes de administração do anticorpo. 1 a

7 dias após a administração do anticorpo, células CD20 positivas foram reduzidas em torno de 40% em indivíduos aos quais o anticorpo IgG4P tinha sido administrado. Contudo, 4 dias após a administração, as células CD20 positivas foram reduzidas em apenas cerca de 20% em indivíduos aos quais o anticorpo IgG4PE tinha sido administrado.

A concentração de IL12 no soro foi medida por meio do método ELISA. Sangue coletado da veia femoral foi deixado descansar em temperatura ambiente durante 20 a 60 minutos e, então, centrifugado a 3.000 rpm em temperatura ambiente durante 15 minutos. A concentração de IL12 no soro resultante foi medida usando um kit ELISA para IL12 de macaco (Bio-Source International Inc.). Os resultados são mostrados na Figura 16. Nenhum aumento na produção de IL12 pelo anticorpo IgG4PE foi observado em qualquer ponto de coleta de sangue. Contudo, produção máxima de IL12 pelo anticorpo IgG4P foi observada no 4º dia.

Exemplo 16: Efeito de anticorpo antagonista anti-CD40 sobre o modelo de hipersensibilidade retardada em macacos cynomolgus

Nove macacos cynomolgus machos foram intradérmica e intramuscularmente sensibilizados com toxóide do tétano (TTx) (10 Lf/ml; Denka Seiken Co., Ltda.) para induzir à hipersensibilidade retardada ao TTx. Ao mesmo tempo, 10 minutos antes de início da sensibilização, 0,1 e 10 mg/kg de um anticorpo 4D11G4PE foram intravenosamente administrados a cada um de três animais três vezes (uma por semana) para examinar o efeito do 4D11G4PE sobre a hipersensibilidade retardada. Sob anestesia através de injeção intramuscular de cetamina, a sensibilização foi realizada através de administração intradérmica de TTx às costas (50 µL/local x 12 locais) e administração intramuscular de TTx ao fêmur (0,6 mL/corpo) e o estímulo foi realizado através de administração intradérmica de TTx ao tórax (10 µL/local, 0 a 10 Lf/ml para cada um dos três locais) 21 dias após a sensibilização. 24 e 48 horas após o estímulo, reação da pele nos locais de administração foi observada e avaliada de acordo com o escore de irritação da pele de Draize. Os resultados de determinação da concentração de TTx em cada um dos três locais foram, respectivamente, um valor médio. Os resultados

são mostrados na Figura 17. A administração do anticorpo 4D11G4PE evidentemente inibiu a reação de hipersensibilidade retardada observada 24 e 48 horas após a administração.

O efeito do TTx sobre as titulações de anticorpo IgG e IgM TTx-específicos foi examinada. Sangue coletado da veia femoral ao longo do tempo foi deixado descansar em temperatura ambiente durante 20 e 60 minutos e, então, centrifugado a 3.000 rpm em temperatura ambiente durante 15 minutos. A titulação de anticorpo no soro resultante foi medida usando um método ELISA. O método ELISA foi realizado como segue. 100 μ l/cavidade de TTx (0,5 Lf/ml) foram adicionados a cada cavidade de uma microlâmina com 96 cavidades para ELISA (Maxisorp, fabricado pela Nunc S/A) e incubados a 4 °C para fazer com que o TTx fosse adsorvido sobre a mesma. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e um reagente de bloqueio (tampão de fosfato contendo 0,5% de BSA) foi adicionado a cada cavidade e incubado em temperatura ambiente para realizar o bloqueio. Então, cada cavidade foi lavada com um tampão de fosfato (PBS-T) contendo 0,05% de Tween 20 três vezes. Em seguida, cada soro diluído com PBS-T contendo 0,5% de BSA (diluição a 100 a 819.200 vezes, ampliação de diluição: 2; 100 μ l/cavidade) foi adicionado a cada cavidade e incubado e reagido em temperatura ambiente durante duas horas. A microlâmina foi lavada com PBS-T três vezes. Então, uma diluição a 3.000 vezes de um anticorpo anti-IgG de macaco de bezerro ou anticorpo IgM rotulado com peroxidase (Nordic Immunology) com PBS-T contendo 0,5% de BSA (100 μ g/cavidade) foi adicionada a cada cavidade e incubada em temperatura ambiente durante uma hora. Em seguida, a microlâmina foi lavada com PBS-T e, então, uma solução de substrato de coloração (100 μ l/cavidade, cloridrato de o-fenilenodiamina + peróxido de hidrogênio aquoso) foi adicionada a cada cavidade. A absorbância em um comprimento de onda de 492 nm foi medida usando um leitor para microlâmina. A titulação de anticorpo anti-TTx foi definida como uma ampliação de diluição máxima para tornar a absorbância 0,1 e mais. A titulação de anticorpo era 0 quando a absorbância não atingia 0,1 mesmo em uma diluição de 100 vezes. Os resultados são mostrados nas

Figuras 18 e 19. Administração de 1 mg/kg de 4D11G4PE suprimiu as titulações de anticorpo IgG e IgM TTx-específicos para cerca de 1/10. Quando 10 mg/kg de 4D11G4PE foram administrados, as titulações de anticorpo estavam abaixo da sensibilidade de detecção em qualquer ponto de coleta de sangue.

Exemplo 17: Efeito de anticorpo anti-CD40 antagonista sobre a formação de trombo de plaqueta

Sangue coletado de um ser humano saudável foi dividido em quatro alíquotas (cada uma 6 ml). IgG4PE humana de controle, IgG2a de camundongo de controle, IgG4PE anti-CD40 humano (4D11) e IgG2a anti-CD154 de camundongo (5C8) foram, respectivamente, administrados às frações de modo que cada fração tinha uma concentração de sangue de 100 µg/ml. Uma câmara de perfusão (GlycoTech Corp.) e uma placa de Petri revestida com colágeno foram montados de acordo com as instruções em anexo. O sangue tratado com vários anticorpos foi deixado fluir na câmara em uma taxa que pode aplicar um escoamento de 1.500/s ao sangue durante sete minutos. Após o que, um tampão de fosfato de paraformaldeído a 4% foi deixado fluir na câmara em uma taxa que pode aplicar um escoamento de 1.500/s ao tampão durante 10 minutos. O agregado de plaquetas formado sobre a placa de Petri foi fixado, corado com um anticorpo CD41a PE-rotulado plaqueta-específico e observado com um microscópio de fluorescência. Os resultados são mostrados nas Figuras 20A e B. O sangue tratado com IgG4PE anti-CD40 humana (4D11) formou um agregado de plaquetas sobre a placa de Petri revestida com colágeno, assim como o sangue tratado com os anticorpos de controle. Contudo, o sangue tratado com IgG2a anti-CD154 humana de camundongo não formaram um agregado de plaquetas.

Exemplo 18: Avaliação de estabilidade do anticorpo anti-CD40 antagonista

Anticorpos com região constante modificada do anticorpo 4D11 foram comparados e examinados em termos de estabilidade. No método de avaliação, os sobrenadantes de cultura obtidos através de expressão transitória, respectivamente, de G4P, G4PE, G2Ser e G4/2/4 em células HEK293 foram carregados com uma coluna Proteina (Amersham Pharmacia Biotech),

274

eluídos com um tampão de citrato a 0,1M (pH de 2,7) e, então, incubados a 37 °C durante 1 minuto e 10 minutos. Após o que, eles foram neutralizados com um tampão de fosfato a 50 nM (pH de 7,0). O teor de oligômeros nas soluções de anticorpo resultantes foi medido usando uma coluna de filtração em gel (Tosoh Corp.). Como um resultado, descobriu-se que o teor de oligômeros aumenta na proporção com o tempo de incubação e G4/2/4 produz um oligômero primeiro, G4PE em segundo, em terceiro G2Ser e G4P por último (Figura 21).

10 Exemplo 19: Efeito de inibição de rejeição a transplante de pele por um anti-corpo anti-CD40 antagonista

Um enxerto coletado da cauda de camundongos DBA/2 foi enxertado no tórax dorsal lateral de camundongos C57BL/6 tendo uma base genética pelo qual eles eram homozigóticos para CD40 decomposta endógena de camundongo e traziam um transgene de um gene de CD40 humano e o enxerto foi fixado com um prendedor durante sete dias. 100 µg de uma substância de teste 4D11G4PE ou um veículo foram administrados à veia caudal 0, 2, 4, 7, 9, 11 e 14 dias após o enxerto de pele, respectivamente. Para inibir a rejeição ao enxerto pelas células NK, 100 µg do anticorpo antiasialo GML foram intraperitonealmente administrados a todos os camundongos 3 dias antes da operação e 1, 4 e 9 dias após a operação. Os resultados são mostrados na Figura 22. O retardo na rejeição ao enxerto foi observado como sendo significativo no grupo administrado com 4D11G4PE quando comparado ao grupo administrado com veículo.

25 Exemplo 20: Análise de expressão de CD40 em linhagens de células tumorais humanas

A expressão de CD40 na linhagem de células Ramos de linfoma de Burkitt, linhagem de células T24 de câncer de bexiga (ATCC, HTB-4), linhagem de células Hs 766T de câncer pancreático (ATCC, HTB-134) e Capan-2 (ATCC, HTB-80) foi confirmada através de análise por FACS usando 341G2Ser.

T24, Hs 766T e Capan-2 foram digeridas com tripsina e coletadas e Ramos foi coletada como estava. As linhagens de células foram lava-

das com PBS e, então, ressuspensas no tampão de coloração contendo 1 $\mu\text{g/ml}$ de 341G2Ser. O tampão de coloração foi preparado através de adição de EDTA a 0,05M, 0,05% de azida de sódio e 5% de soro bovino imobilizado ao PBS. Após incubação a 4 °C durante 15 minutos, as células foram lavadas com o tampão de coloração duas vezes e ressuspensas em uma diluição a 1:250 de IgG anti-humana de bezerro PE-ligado (γ) (Southern Biotechnology Associates, Inc) com o tampão de coloração. Após incubação a 4 °C durante 15 minutos, as células foram lavadas com o tampão de coloração duas vezes e analisadas com um FACSCalibur (fabricado pela BD Biosciences). A mesma quantidade de um anticorpo anti-2,4-dinitrofenol (DNP) humano foi usada como um controle negativo. A análise foi realizada usando Cellquest (fabricado pela BD Biosciences) como um software de análise de dados para calcular a intensidade média de fluorescência.

Como um resultado, Ramos, T24, Hs766T e Capan-2 tinham intensidade média de fluorescência obviamente maior do que aquela do controle negativo quando coradas com 341G2Ser e, assim, a expressão de CD40 foi confirmada.

Exemplo 21: Efeito de anticorpo anti-CD40 agonista sobre linhagens de células de tumor humano

2,5 $\times 10^3$ células Ramos, 2,5 $\times 10^2$ células T24, 5 $\times 10^3$ células Hs766T e 5 $\times 10^3$ células Capan-2 foram, respectivamente, suspensas em meio para compor um volume total de 100 μL na lâmina com 96 cavidades de fundo plano (fabricada pela Falcon). Ramos e Hs766T, Capan-2 e T24 foram cultivadas durante 66 horas, 90 horas e 114 horas, respectivamente, junto com 341G2Ser em uma concentração de 1 ng/ml a 1.000 ng/ml a 37 °C na presença de 5% de CO_2 . 10 μL (L (3,7 MBq/mL) de timidina ^3H -rotulada (fabricada pela Amersham Biosciences) foram adicionados e cultivados a 37°C na presença de 5% de CO_2 durante seis horas. Células Ramos foram coletadas sobre um Printed Filtermat A (fabricado pela PerkinElmer, Inc.) usando um coletor de 96 microcélulas (fabricado pela Skatron Instruments, Inc.) e cobertas com um saco para amostras (fabricado pela PerkinElmer, Inc.). 12 mL de Betaplate Scint (fabricado pela PerkinElmer, Inc.) foram adi-

cionados e a dose de raios β foi medida com um contador de cintilação de líquido (Pharmacia 1205 Betaplate: fabricado pela Pharmacia Corp.). Células Hs 766T, células T24 e células Capan-2 foram, respectivamente, coletadas sobre um Unifilter (fabricado pela PerkinElmer, Inc.) usando um coletor (fabricado pela PerkinElmer, Inc.). Uma vedação especial foi presa por trás de cada filtro e 20 μL /cavidade de MicroScint 20 (fabricado pela PerkinElmer, Inc.) foram adicionados aos mesmos. A dose de raios β foi medida com um contador de cintilação (TopCount: fabricado pela Packard Instrument Co., Inc.). Os dados foram expressos como as taxas de sobrevivência de células (%) obtida através de divisão de uma média de três medições obtidas em três testes independentes por um valor do controle sem tratamento.

Como um resultado, as taxas de sobrevivência de células eram reduzidas em todas as linhagens de células dependendo da concentração de 341G2Ser (Tabela 1). Quando da adição de 100 ng/ml de 341G2Ser, a taxa de sobrevivência de células Ramos era de 58%, a taxa de sobrevivência de células T24 era de 22%, a taxa de sobrevivência de células Hs 766T era de 15% e a taxa de sobrevivência de células Capan-2 era de 77%. Descobriu-se que 341G2Ser tinha atividade na inibição do crescimento de células Ramos, células T24, células Hs 766T e células Capan-2.

20 Tabela 1

Taxa de sobrevivência de células

Linhagem de células	Concentração de 341G2Ser (ng/ml)			
	1	10	100	1000
Ramos	98,49%	81,68%	57,77%	55,26%
T24	97,94%	50,72%	21,97%	25,35%
Hs 766T	34,67%	21,50%	14,67%	15,18%
Capan-2	100,94%	85,34%	76,76%	72,89%

Exemplo 22: Efeito de anticorpo anti-CD40 agonista sobre um modelo de camundongos tendo câncer

(1) Células Ramos

Camundongos nus Balb/c fêmeas de seis semanas de idade (adquiridos da CLEA Japan, Inc.) foram irradiados com radiação 3Gy e 2×10^7 células/camundongo das células Ramos foram subcutaneamente enxer-

tadas nas costas dos mesmos. 16 dias após o enxerto, o tamanho dos tumores foi medido. Camundongos tendo câncer tendo um tamanho de tumor de 50 a 170 mm³ foram classificados em grupos consistindo em cinco camundongos cada um. 100 µg/camundongo de 341G2Ser (uma solução de 200 µl em PBS contendo 1% de soro de camundongo nu) foram intravenosamente administrados aos camundongos tendo câncer uma vez no 16° dia e o tamanho do tumor foi medido até o 47° dia. A mesma quantidade de um anticorpo à albumina do soro humano (HAS) foi usada como um controle negativo.

10 (2) Células T24

Uma massa de células T24 que tinha sofrido passagem subcutânea nas costas de camundongos nus três vezes foi removida e subcutaneamente enxertada sobre as costas de camundongos nus Balb/c fêmeas de seis semanas de idade (adquiridos da CLEA Japan, Inc.). A massa de células de tumor a ser enxertada tem, apropriadamente, cerca de 3 mm². 10 dias após o enxerto, o tamanho dos tumores enxertados foi medido. Camundongos tendo câncer tendo um tamanho de tumor de 80 a 200 mm³ foram classificados em grupos consistindo em cinco camundongos cada um. 100 µg/camundongo de 341G2Ser (uma solução de 200 µl em PBS contendo 1% de soro de camundongo nu) foram intravenosamente administrados aos camundongos tendo câncer uma vez no 10° dia e o tamanho do tumor foi medido até o 29° dia. A mesma quantidade de um anticorpo anti-DNP humano foi usada como um controle negativo.

(3) Células Hs 766T

25 7×10^5 células/camundongo de células Hs 766T foram subcutaneamente enxertadas nas costas de camundongos nus Balb/c fêmeas de oito semanas de idade (adquiridos da CLEA Japan, Inc.). 16 dias após o enxerto, o tamanho dos tumores enxertados foi medido. Camundongos tendo câncer tendo um tamanho de tumor de 50 a 140 mm³ foram classificados em
30 grupos, cada um consistindo em cinco camundongos. 100 µg/camundongo de 341G2Ser (uma solução de 200 µl em PBS contendo 1% de soro de camundongo nu) foram intravenosamente administrados aos camundongos

tendo câncer uma vez no 16º dia e o tamanho do tumor foi medido até o 32º dia. A mesma quantidade de um anticorpo anti-DNP humano foi usada como um controle negativo.

(4) Células Capan-2

5 2×10^6 células/camundongo de células Capan-2 foram subcutaneamente enxertados nas costas de camundongos nus Balb/c fêmeas de seis semanas de idade (adquiridos da CLEA Japan, Inc.). Após 13 dias do enxerto, o tamanho dos tumores enxertados foi medido. Camundongos tendo câncer tendo um tamanho de tumor de 30 a 130 mm³ foram classificados em grupos, cada um consistindo em cinco camundongos. 10 ou 100 µg/camundongo de 341G2Ser (uma solução em 200 µl de PBS contendo 1% de soro de camundongo nu) foram intravenosamente administrados aos camundongos tendo câncer duas vezes por semana a partir de 13º dia e o tamanho do tumor foi medido até o 34º dia. Um anticorpo policlonal humano (hIgG) (fabricado pela Sigma Co.) foi usado como um controle negativo.

15 A proporção de inibição do crescimento de tumor (TGIR) foi calculada a partir da seguinte fórmula:

100-[(volume médio do tumor do grupo administrado com 341G2Ser no último dia de medição – volume médio de tumor do grupo administrado com 341G2Ser no dia de início de administração do anticorpo)/(volume médio de tumor do grupo administrado com controle negativo no último dia de medição – volume médio de tumor do grupo administrado com controle negativo no dia de início de administração do anticorpo)] × 100]

25 Como um resultado, a TGIR excedeu a 100% nos camundongos trazendo câncer T24, Hs766T e Capan-2 e uma diminuição no volume de tumor foi observada nos camundongos. Por outro lado, a TGIR era de 73,4% nos camundongos trazendo câncer de Ramos e um aumento no volume de tumor foi consideravelmente suprimido nos camundongos (Tabela 2). As Figuras 23 a 26 mostram, respectivamente, a alteração no volume do tumor de camundongos trazendo câncer aos quais células Ramos, células T24, células Hs 766T e células Capan-2 foram, respectivamente, enxertadas.

30

Tabela 2

Proporção de inibição de tumor

Linhagem de células	Quantidade de 341G2Ser administrada	
	10 µg/cabeça	100 µg/cabeça
Ramos	-	73,40%
T24	-	109,05%
Hs 766T	-	108,55%
Capan-2	103,49%	119,20%

A proporção de inibição em cada linhagem de células é um valor do último dia de medição.

Aplicabilidade Industrial

- 5 Conforme mostrado nos Exemplos, o anticorpo anti-CD40 da presente invenção tendo uma região constante na qual uma mutação é introduzida e um anticorpo anti-CD40 no qual uma parte da estrutura da subclasse é substituída por uma da outra subclasse têm atividade de ADCC e atividade de CDC reduzidas, ao mesmo tempo em que mantêm sua atividade.
- 10 de. Conseqüentemente, um anticorpo da presente invenção tem sua citotoxicidade reduzida por células que expressam CD40 quando administrado a um indivíduo como um anticorpo terapêutico e, assim, pode ser usado com segurança.

- 15 Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados no presente relatório descritivo são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Listagem de Seqüência

SEQ ID NOS: 2 a 36: DNAs sintéticos

SEQ ID NOS: 49 a 130: peptídeos sintéticos

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal, caracterizado pelo fato de que consiste de uma cadeia pesada representada por uma sequência de aminoácidos a partir de Q na posição 27 a K na posição 474 da SEQ ID NO: 140 e uma cadeia leve representada por uma sequência de aminoácidos a partir de A na posição 23 a C na posição 235 da SEQ ID NO: 142.

2. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 1, como um ingrediente ativo.

3. Uso do anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para a produção de uma composição farmacêutica para a prevenção ou o tratamento de rejeição a transplante, doenças auto-imunes, alergia ou inibição do fator VIII de coagulação sanguínea.

Fig. 1A-1

Sequência	2105	KM643-4-11	F2-103	110	KM341-1-19
1. EPPTACREKQYLI	16353	13220	31427	13403	14108
2. PTACREKQYLINS	17358	13220	39202	13575	14194
3. ACREKQYLINSQC	20267	13212	35911	13681	14013
4. REKQYLINSQCCS	17096	13305	43762	13685	13952
5. KQYLINSQCCSLC	23249	13292	36839	13894	13779
6. YLINSQCCSLCQP	16140	13470	44975	13964	13909
7. INSQCCSLCQPGQ	15918	13390	54811	13652	13751
8. SQCCSLCQPGQKL	18804	13271	60441	13872	13819
9. CCSLCQPGQKLVS	16534	13436	56601	13821	13851
10. SLCQPGQKLVSDC	18155	13314	54718	13705	13965
11. CQPGQKLVSDCTE	17614	13460	52073	13899	13781
12. PGQKLVSDCTEPT	91270	13334	58177	13464	13725
13. QKLVSDCTEFTET	96926	13465	49003	14916	13875
14. LVSDCTEFTETEC	141877	13634	62580	13394	13783
15. SDCTEFTETECLP	148692	13213	42916	13571	13696
16. CTEFTETECLPCG	145926	13591	38170	13220	13824
17. HFTETECLPCGES	136350	13693	56597	13434	13638
18. TETECLPCGESEF	77805	13298	33201	13398	13723
19. TECLPCGESEFLD	50648	13544	29781	13488	13685
20. CLPCGESEFLDTW	79246	13736	26075	13599	13807
21. PCGESEFLDTWNR	93482	13626	44337	16142	13830
22. GESEFLDTWNRET	68932	14815	45811	13777	13832
23. SEFLDTWNRETHC	105899	13777	40462	14023	13898
24. FLDTWNRETHCHQ	65803	15498	79990	40210	13937
25. DTWNRETHCHQHK	18237	13367	34525	13995	13737
26. WNRETHCHQHKYC	22963	13843	32912	15601	13595
27. RETHCHQHKYCDP	16522	13282	41600	13644	13595
28. THCHQHKYCDPNL	25181	13211	32264	13567	13621
29. CHQHKYCDPNLGL	16455	13300	34480	13684	13671
30. QHKYCDPNLGLRV	16627	13541	39057	13461	13670
31. KYCDPNLGLRVQQ	16429	13491	46485	13452	13779
32. CDPNLGLRVQQKG	16877	13454	90926	13293	13799
33. PNLGLRVQQKGTS	18117	13611	123330	13358	13917
34. LGLRVQQKGTS	22898	13512	237353	13381	15032
35. LRVQQKGTSSETDT	24787	13599	250401	13364	13774
36. VQKGTSSETDTIC	28492	13372	35303	13124	13686
37. QKGTSSETDTICTC	27724	13490	35334	13298	13569
38. GTSETDTICTCEE	18634	13340	29905	13289	13525
39. SETDTICTCEEGW	16914	13340	24871	13315	13486
40. TDTICTCEEGWHC	17866	13568	24475	13481	13631

Fig. 1A-2

Sequência	2105	KM643-4-11	F2-103	110	KM341-1-19
41. TICTCEEGWHCTS	18122	13767	24169	13564	68670
42. CTCEEGWHCTSEA	17485	18955	28190	13736	75214
43. CEEGWHCTSEACE	16859	41843	32056	13525	16033
44. EGWHCTSEACESC	17735	13381	35518	13771	13867
45. WHCTSEACESCVL	64890	13444	38190	13708	13687
46. CTSEACESCVLHR	16788	13446	39497	13859	13636
47. SEACESCVLHRSC	16421	13555	40206	13482	13584
48. ACESCVLHRSCSP	15795	13183	36735	13503	13575
49. ESCVLHRSCSPGF	47038	13504	41251	14500	13637
50. CVLHRSCSPGFGV	17469	13279	45795	13484	13573
51. LHRSCSPGFGVKQ	16635	13382	88644	13187	13667
52. RSCSPGFGVKQIA	16642	13339	114128	13368	13623
53. CSPGFGVKQIATG	17457	13485	110624	13323	13703
54. PGFGVKQIATGVS	18818	13577	253876	13234	13769
55. FGVKQIATGVSDT	20521	13429	697242	13178	13903
56. VKQIATGVSDTIC	20855	13510	91544	13176	13681
57. QIATGVSDTICEP	19014	13523	40193	13154	13575
58. ATGVSDTICEPCP	17139	13526	38012	13127	13599
59. GVSDTICEPCPVG	16515	13508	31118	13376	13571
60. SDTICEPCPVGFF	42762	13590	25542	13392	13534
61. TICEPCPVGFFSN	25039	13366	27921	13524	13783
62. CEPVGVGFFSNVS	18141	13429	31377	14364	13717
63. PCPVGVGFFSNVSSA	20806	13343	51411	19243	13979
64. PVGVGFFSNVSSAFE	95541	14553	128669	158203	14523
65. GFFSNVSSAFEK	67908	13506	94016	14323	13831
66. FSNVSSAFEKCHP	22379	13350	124184	14057	13699
67. NVSSAFEKCHPWT	18703	13298	44966	13518	13676
68. SSAFEKCHPWTSC	19809	13459	37784	13433	13553
69. AFEKCHPWTSCET	16212	13387	38013	13279	13683
70. EKCHPWTSCETKD	15198	13423	39248	13315	13494
71. CHPWTSCETKDLV	15754	13383	40627	13228	13673
72. PWTSCETKDLVVQ	15609	13426	46662	13247	13613
73. TSCETKDLVVQQA	16454	13377	46750	13228	13670
74. CETKDLVVQQAGT	16875	13544	42504	13185	13700
75. TKDLVVQQAGTNK	17357	14026	83860	13184	13674
76. DLVVQQAGTNKTD	17735	13434	34853	13154	13776
77. VVQQAGTNKTDVV	17176	13805	51573	13166	13651
78. QQAGTNKTDVVCG	15794	13261	27337	13103	13398
79. AGTNKTDVVCGPQ	15793	13448	25989	13304	13658
80. TNKTDVVCGPQDR	15114	13481	24807	13199	13767
81. KTDVVCGPQDRLR	15782	13328	35951	13548	14112
82. DVVCGPQDRLRAL	16644	13255	33393	13756	14104

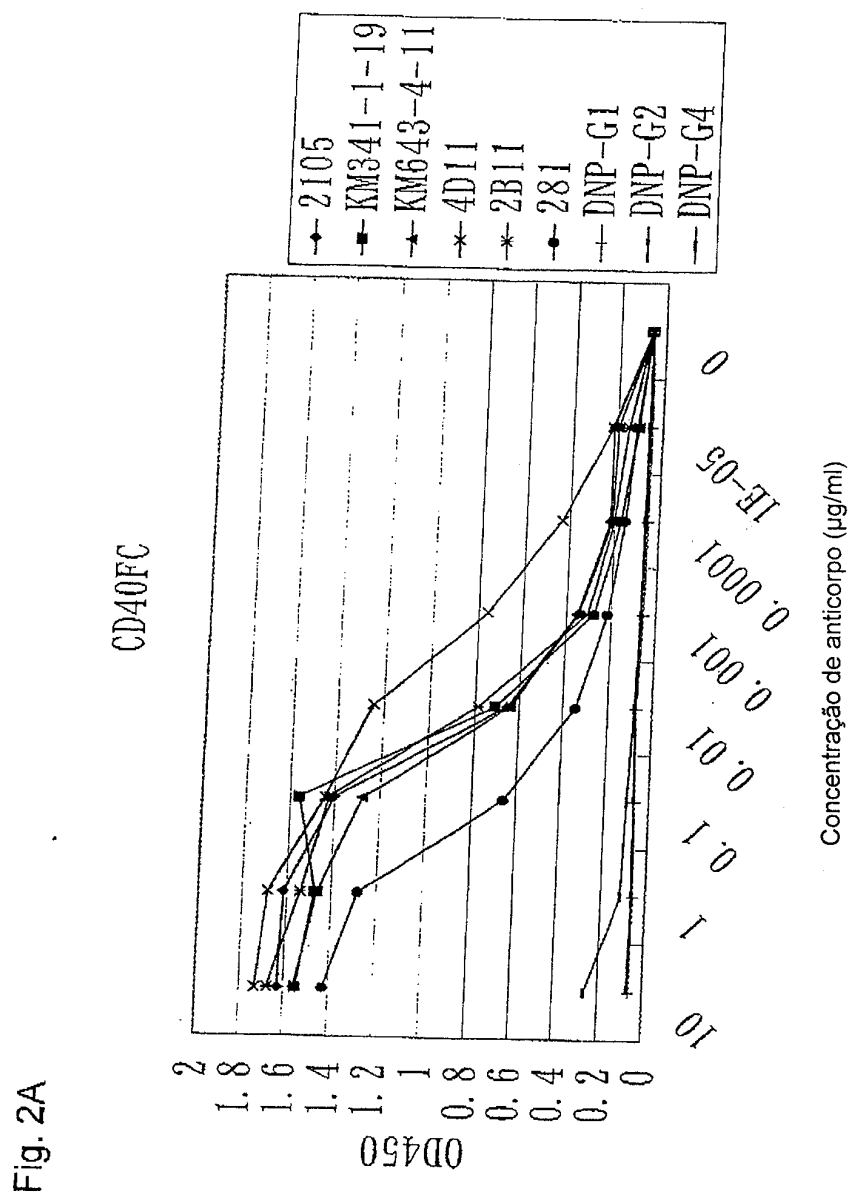
Fig. 1B-1

Sequência	F4-465	2B1-1-10	2B11	F72	F76	4D11
1. EPPTACREKQYLI	20561	4194	14158	3965	3348	14138
2. PTACREKQYLINS	19249	4141	14276	3906	3420	14387
3. ACREKQYLINSQC	20418	4221	14276	3884	3300	14044
4. REKQYLINSQCCS	20278	4080	14214	3849	3546	13956
5. KQYLINSQCCSLC	19642	4169	14082	3806	3378	14443
6. YLINSQCCSLCQP	19658	4184	14231	4082	3464	14432
7. INSQCCSLCQPGQ	18482	4603	13927	3986	3157	13783
8. SQCCSLCQPGQKL	19075	4326	13748	3934	3675	13471
9. CCSLCQPGQKLVS	20282	4349	13576	4046	3336	13431
10. SLCQPGQKLVSDC	20175	4841	13522	3948	3222	13367
11. CQPGQKLVSDCTE	22520	4576	13441	4115	3566	13339
12. PGQKLVSDCTEFT	23688	4499	13618	4012	3525	13290
13. QKLVSDCTEFTET	22029	4771	13528	4294	3539	13450
14. LVSDCTEFTETEC	23692	5212	13439	4177	3601	14898
15. SDCTEFTETECPL	25850	4864	13359	4085	3362	13277
16. CTEFTETECPLCG	20943	4906	13496	4121	3582	13874
17. EPTETECPLCGES	37123	4748	13570	3980	3402	16583
18. TETECPLCGESEF	23400	4807	13444	3811	3407	13808
19. TECLPCGESEFLD	21427	4649	13352	3970	3288	13568
20. CLPCGESEFLDTW	18021	4794	19449	3940	5926	47209
21. PCGESEFLDTWNR	26480	7656	86887	5478	16438	165895
22. GESEFLDTWNR	25228	4906	24124	4337	4362	32083
23. SEFLDTWNRTHC	23274	5979	30344	4138	4083	72724
24. FLDTWNRTHCHQ	28280	19544	120439	4636	6401	336496
25. DTWNRTHCHQHCK	20114	4107	14285	4029	3459	14020
26. WNRTHCHQHCKYC	21110	4714	16070	4111	3819	25715
27. RTHCHQHCKYCDP	18452	4075	13942	4000	8252	13612
28. THCHQHCKYCDPNL	18412	4221	14203	3912	3459	14295
29. CHQHCKYCDPNLGL	18890	4288	16566	4025	3473	13866
30. QHCKYCDPNLGLRV	19296	4313	13580	4132	3383	13355
31. KYCDPNLGLRVQO	20430	4460	13469	4254	3651	13357
32. CDPNLGLRVQQKG	28700	4570	13568	5394	4575	13336
33. PNLGLRVQQKGTS	39822	5228	13590	24278	6996	13404
34. LGLRVQQKGTS	52908	4681	13651	7042	4112	13400
35. LRQVQQKGTS	56965	4376	13514	4839	16879	13357
36. VQQKGTS	21684	4531	13423	3980	3258	13355
37. QKGTS	21838	4509	13507	3976	3355	13365
38. GTSETDTICTCE	21896	4074	13348	3856	3298	13453
39. SETDTICTCEEGW	18789	4082	13377	3687	3297	13806
40. TDTICTCEEGWHC	17729	4187	13485	3756	3638	19679

151

Fig. 1B-2

Sequência	F4-465	281-1-10	2B41	F72	F76	4D11
41. TICTCEEGWHCTS	22932	4207	14559	4151	3992	46128
42. CTCEEGWHCTSEA	22823	4167	14428	4077	3994	14309
43. CCEGWHCTSEACE	25545	4071	14192	4118	3375	14162
44. EGWHCTSEACESC	23481	4272	14290	4171	3993	14029
45. WHCTSEACESCVL	20989	4198	14136	4318	3465	14065
46. CTSEACESCVLHR	20553	4273	14301	4152	3396	14337
47. SEACESCVLHRSC	20792	4234	13900	4122	3439	13877
48. ACESCVLHRSCSP	21818	4179	13741	3934	3525	13539
49. ESCVLHRSCSPGP	20599	4725	13758	4141	3514	13658
50. CVLHRSCSPGPGV	19851	4393	13533	4127	3526	13320
51. LHRSCSPGPGVKQ	23160	4317	13488	4851	18376	13355
52. RSCSPGPGVKQIA	24797	4495	13728	5569	15564	13375
53. CSPGPGVKQIATG	30880	4962	13400	8711	3383	13340
54. PGFGVKQIATGVS	82448	5027	13415	11404	4102	13378
55. FGVKQIATGVSDT	126309	4541	13423	4896	3515	13474
56. VKQIATGVSDTIC	32389	4361	13454	4040	3278	13305
57. QIATGVSDTICEP	28554	4308	13325	3807	3318	13350
58. ATGVSDTICEPCP	-22484	4176	13463	3868	3241	13399
59. GVSDTICEPCPVG	21417	4277	13329	3584	3259	13475
60. SDTICEPCPVGFF	20192	4360	13337	3725	3358	14425
61. TICEPCPVGFFSN	25475	4390	14453	4101	3446	15502
62. CEPVGVGFFSNVS	26387	4419	14370	4434	3538	14441
63. PCPVGVGFFSNVSA	40241	4468	14425	4383	3409	14684
64. PVGVGFFSNVSAFE	27432	11225	85432	4772	5735	49493
65. GFFSNVSAFEKFC	77408	4483	14462	4173	3489	14521
66. FSNVSAFEKCHPW	57923	4088	14050	4230	3296	13989
67. NVSAFEKCHPWTS	23154	4031	13752	4025	3343	13519
68. SSAFEKCHPWTSCT	20994	4170	13512	4006	3419	13468
69. AFEKCHPWTSCTK	21390	4498	13629	4028	3413	13518
70. EKCHPWTSCTKDL	19639	4186	13571	3911	3403	16038
71. CHPWTSCTKDLV	20967	4216	13808	4177	3489	13283
72. PWTSCETKDLVVQ	23271	4300	13420	4459	3316	13507
73. TSCETKDLVVQQA	28353	4890	13457	4411	3496	13462
74. CETKDLVVQQAQT	26955	4517	13389	4600	3403	13433
75. TKDLVVQQAQTG	63164	8695	13475	60382	7609	13271
76. DLVVQQAQTGNTD	25820	4567	13537	4057	3585	13328
77. VVQQAQTGNTD	28426	4587	13372	4179	3418	13309
78. QQAGTNTD	19474	4111	13455	3709	3809	13332
79. AGTNTD	18998	4186	13517	3868	3231	13436
80. TND	18178	4662	13423	3654	4897	13350
81. KTD	27431	4208	13879	4242	4238	13779
82. DVVCGPQDR	28872	4127	14128	4179	3459	13855



CD40mut1

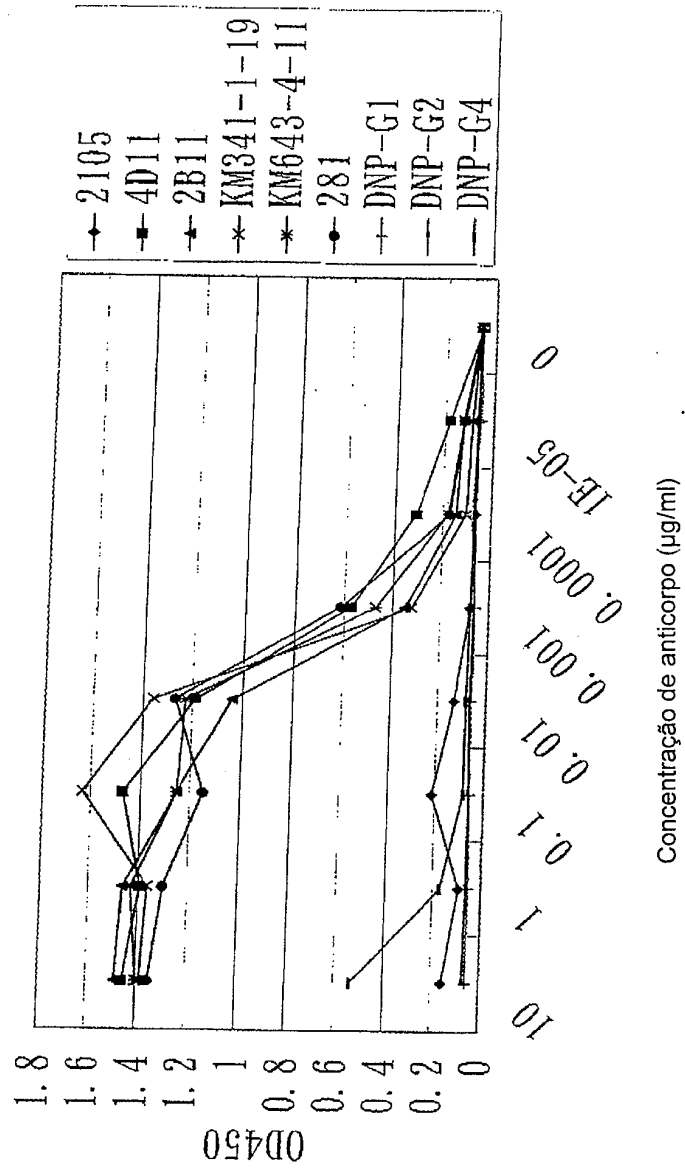
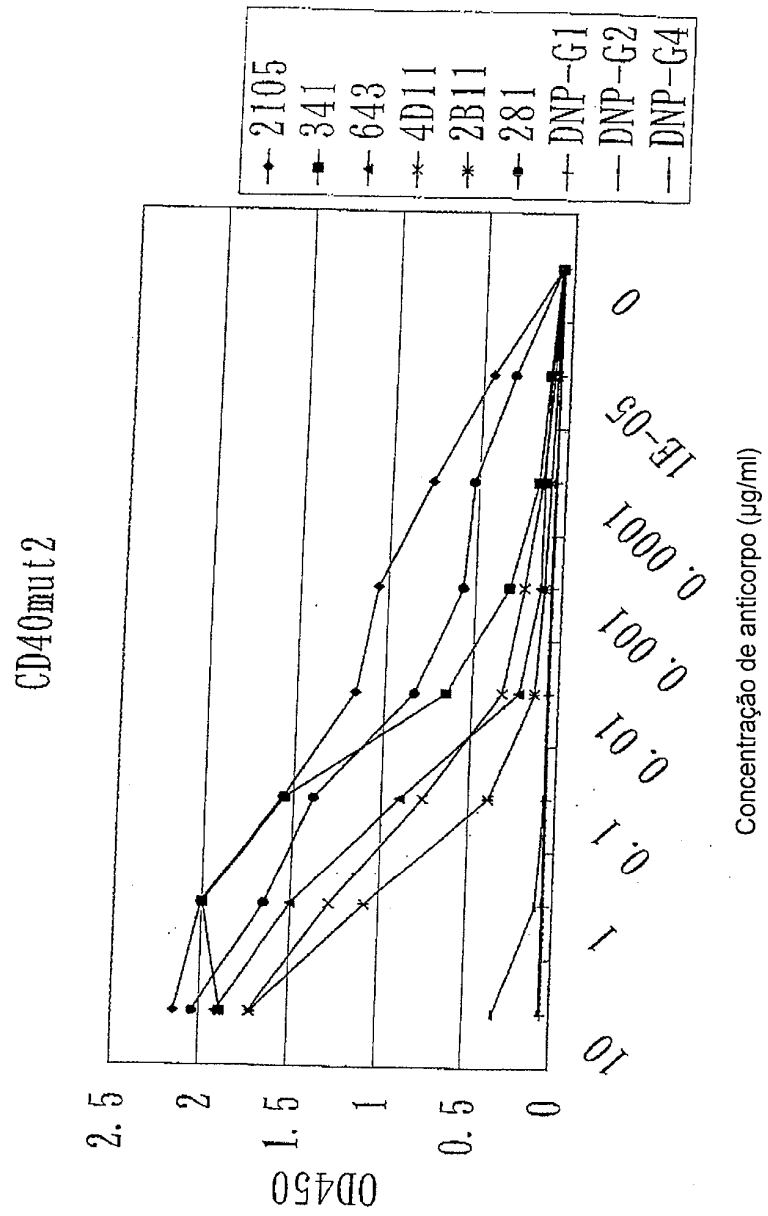


Fig. 2C



155

Fig. 3A

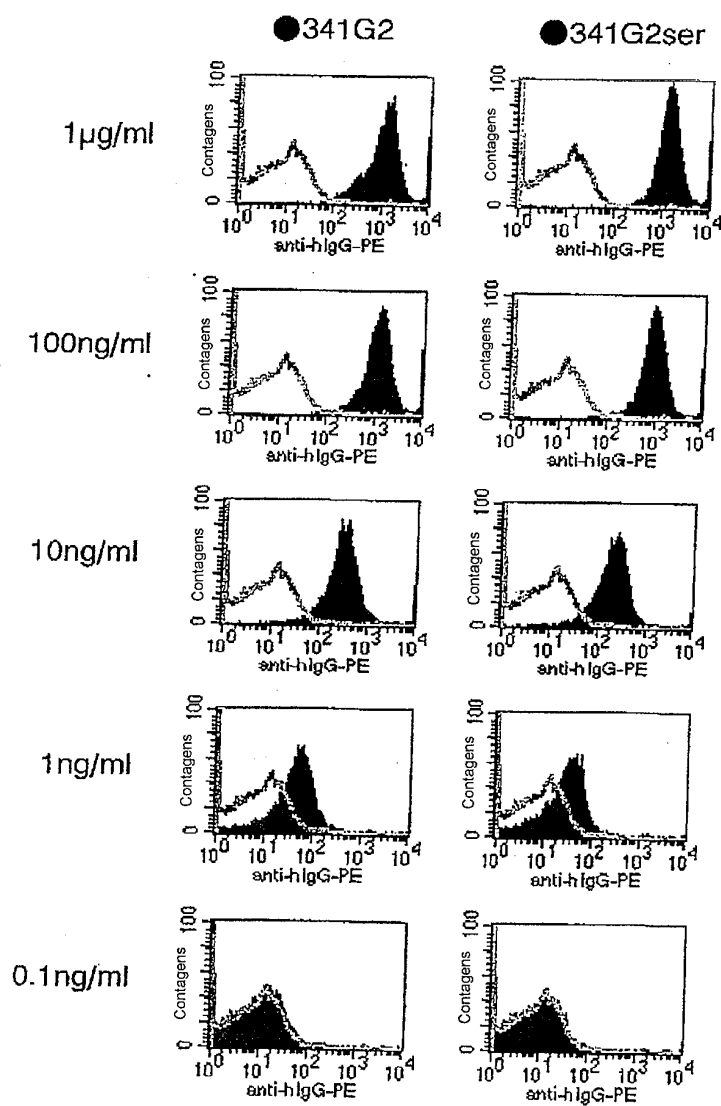
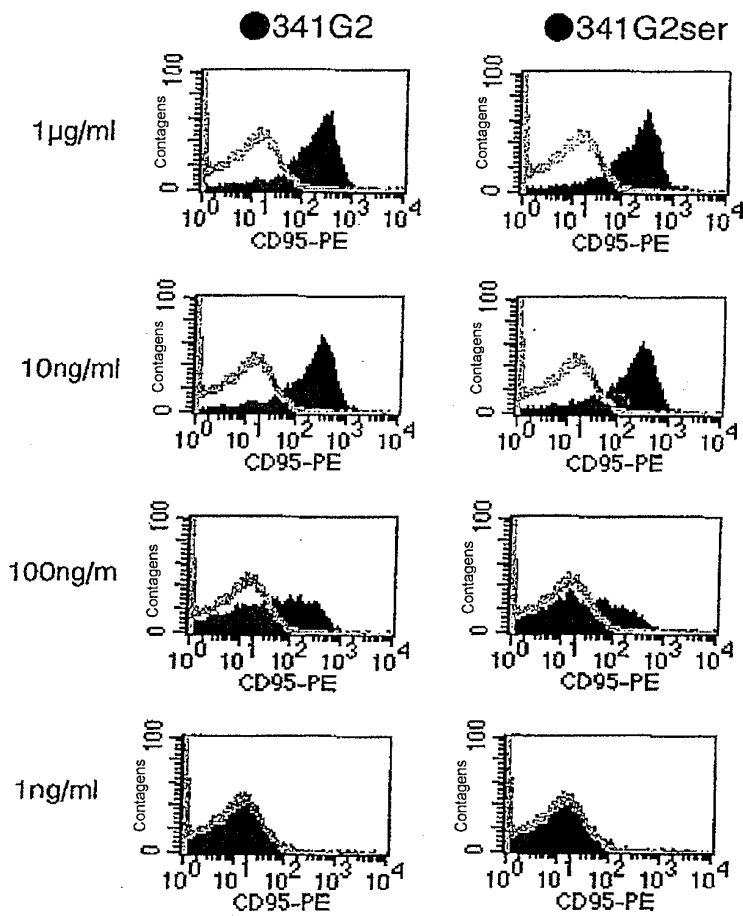


Fig. 3B



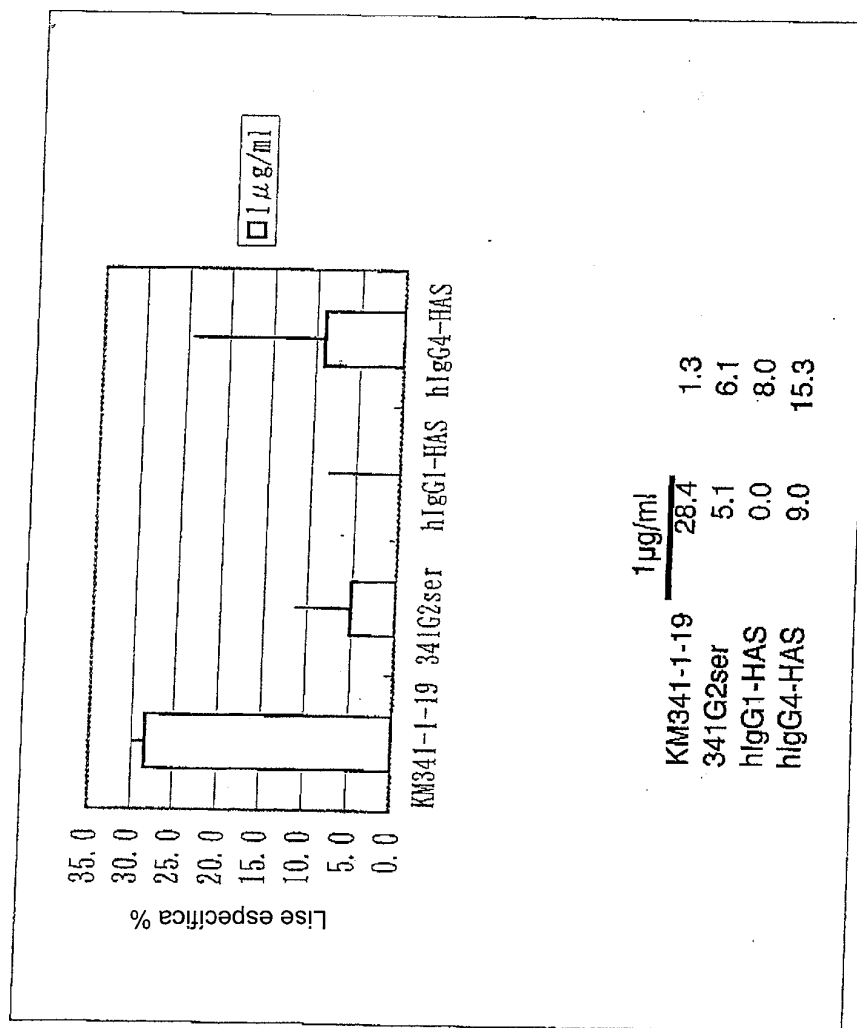


Fig. 4A

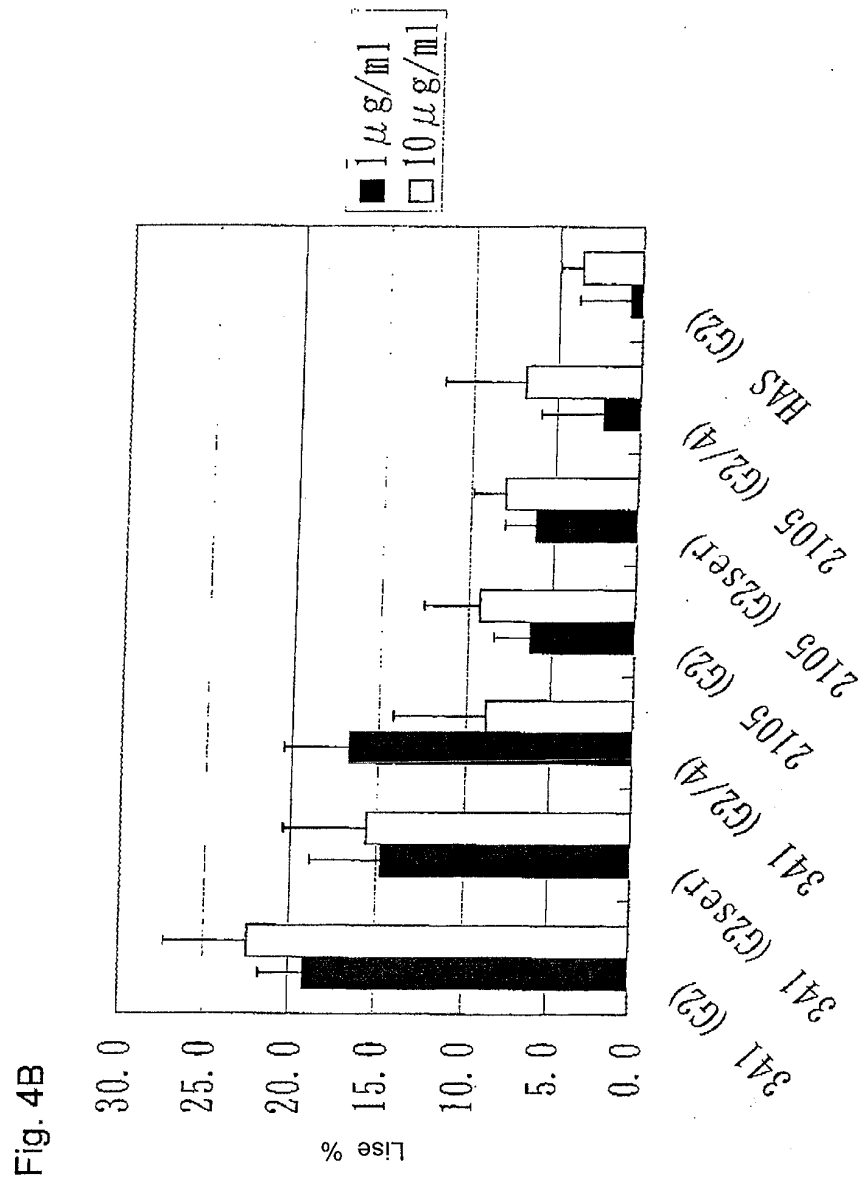
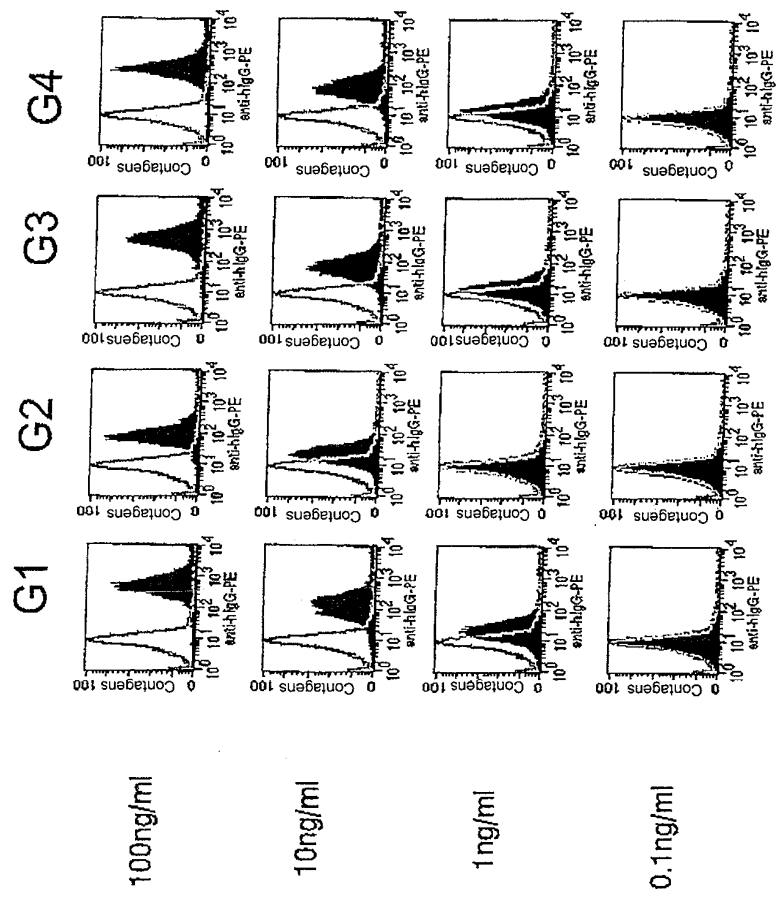
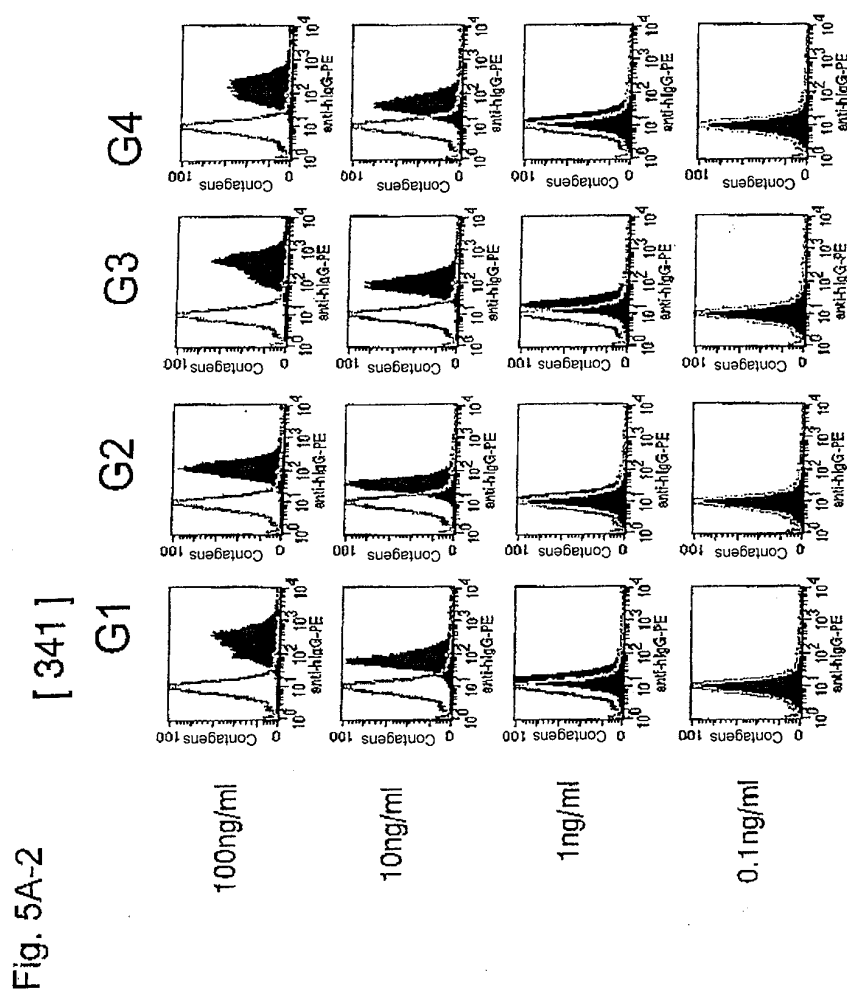
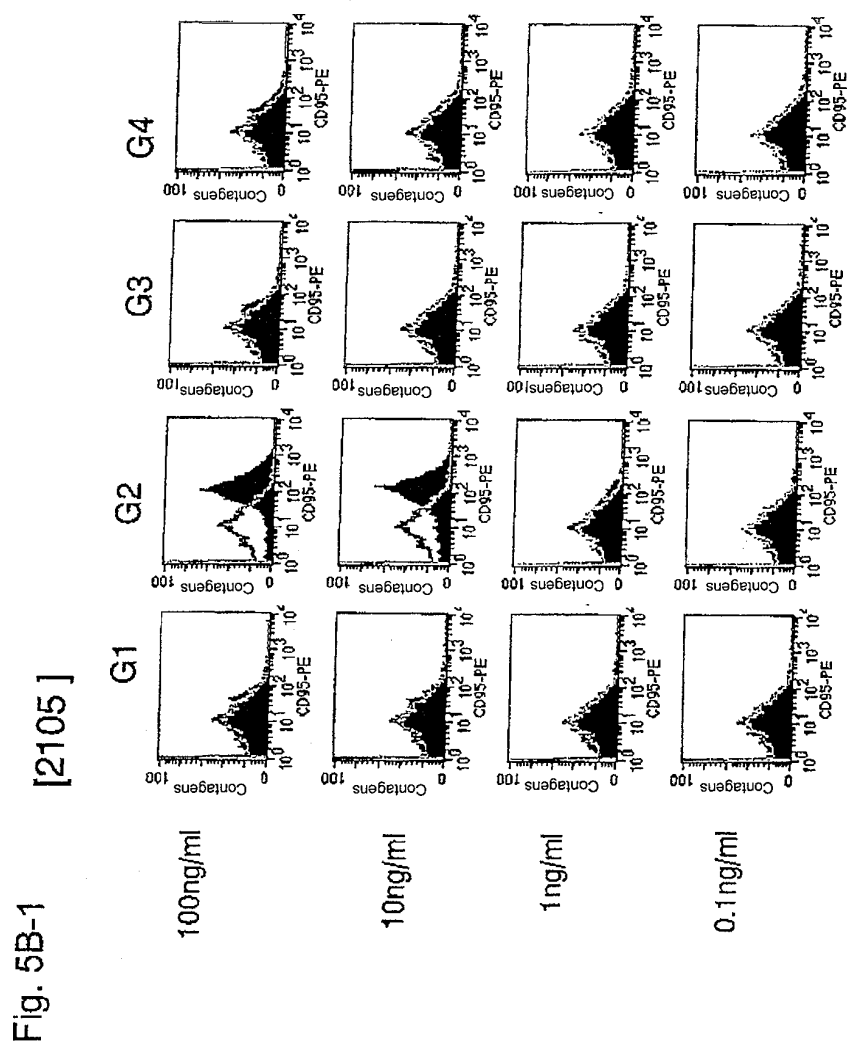
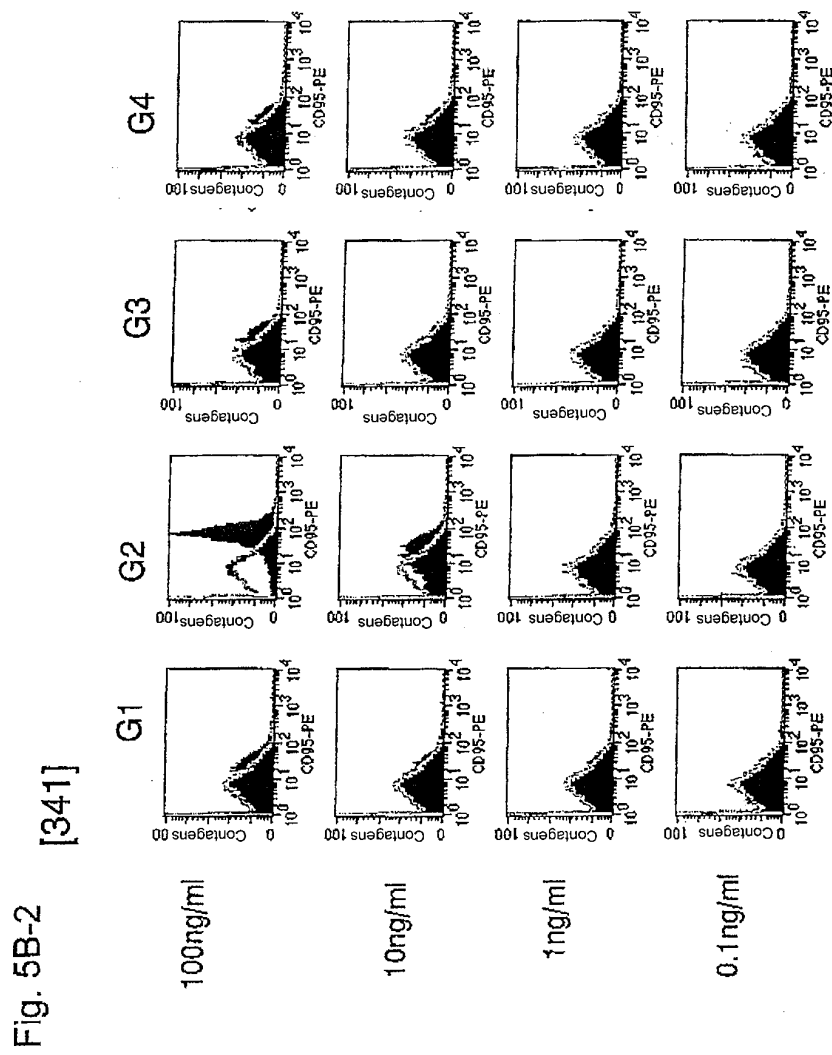


Fig. 5A-1 [2105]









163

Fig. 6A-1

[341]

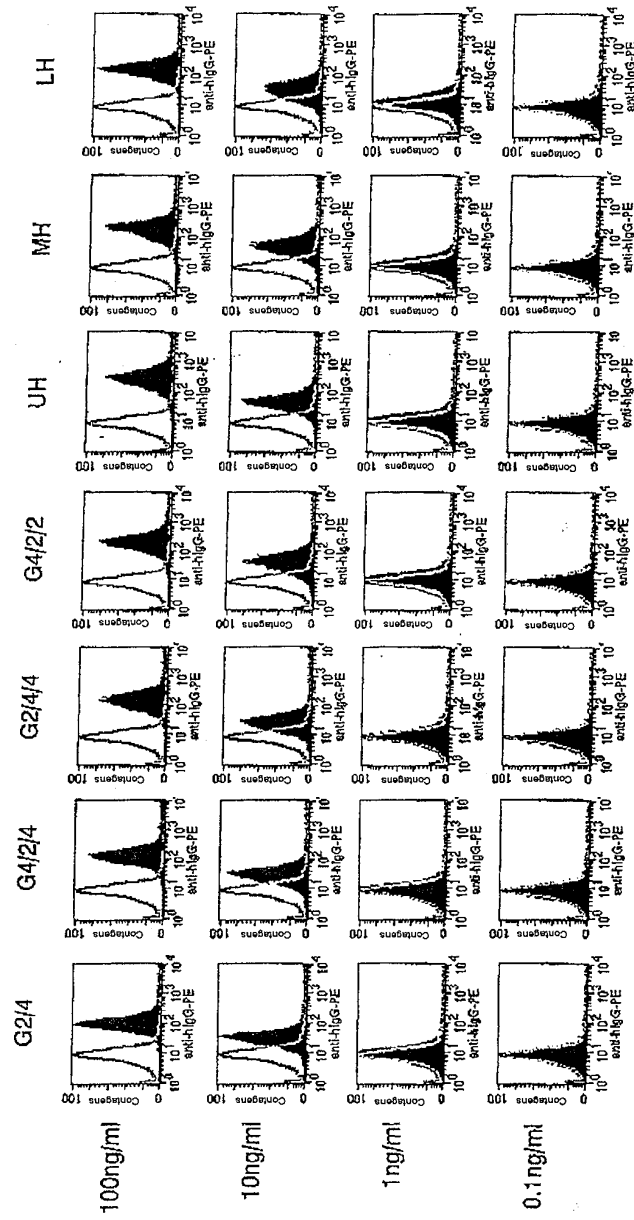
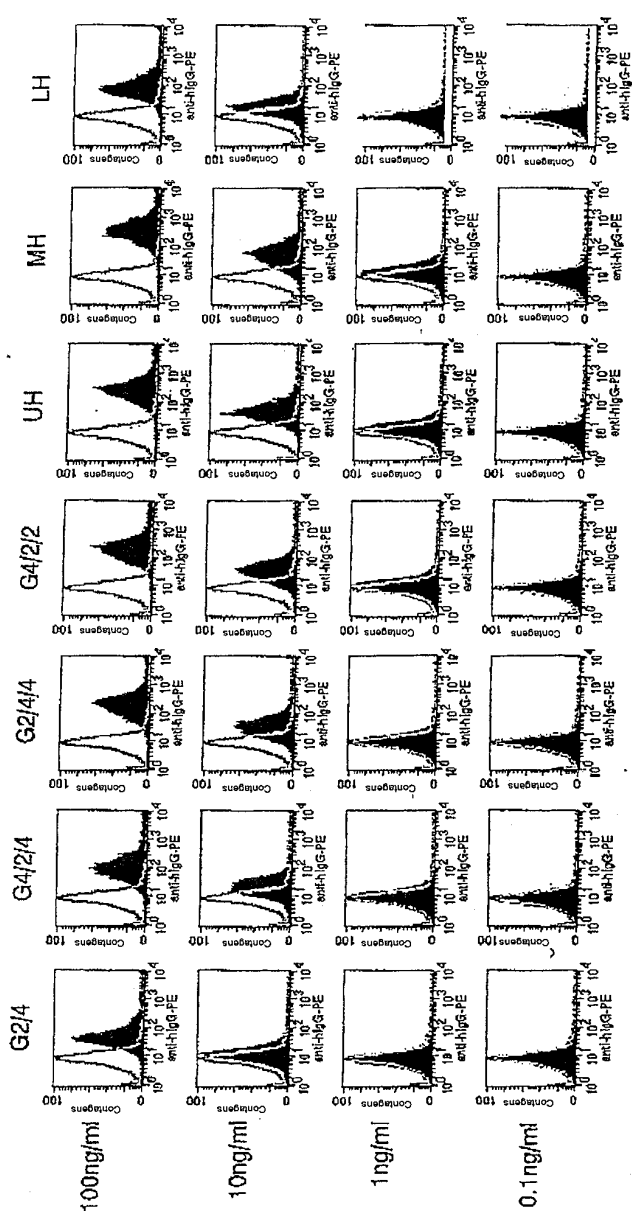


Fig. 6A-2

[2105]



165

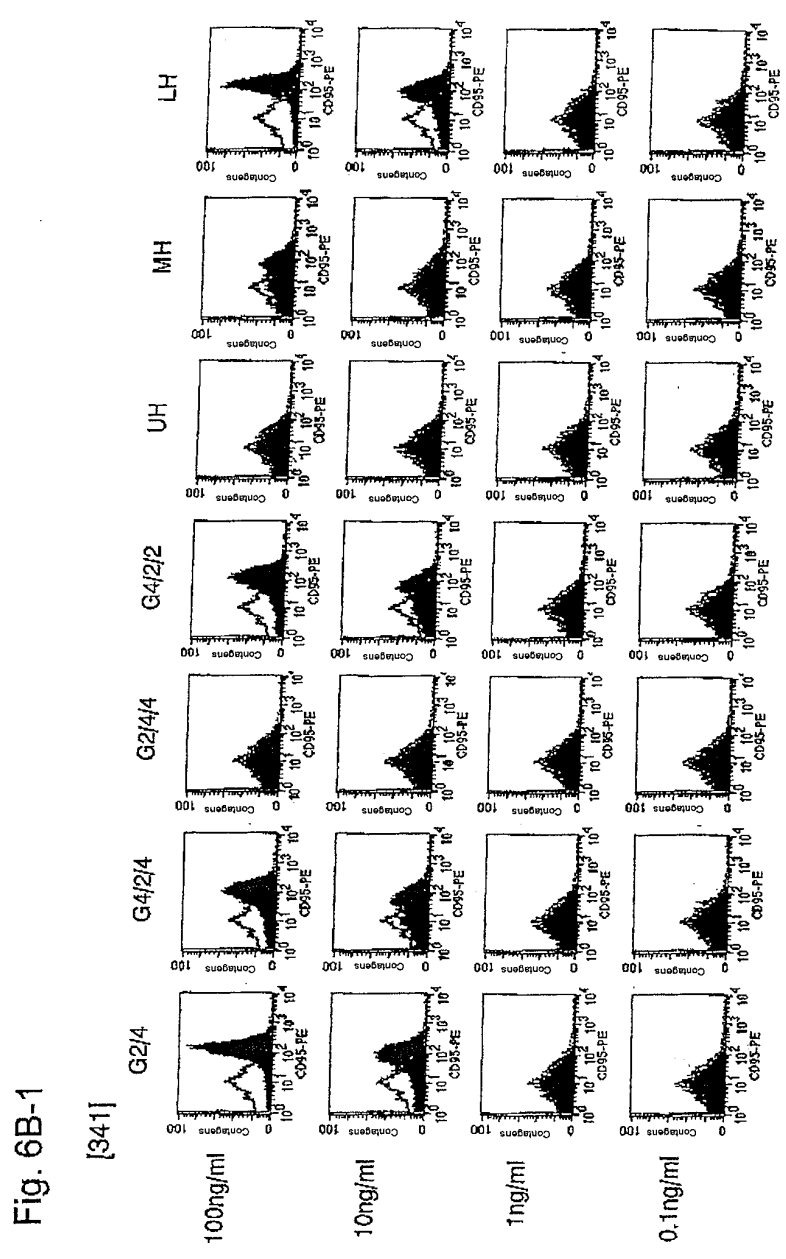


Fig. 6B-2

[2105]

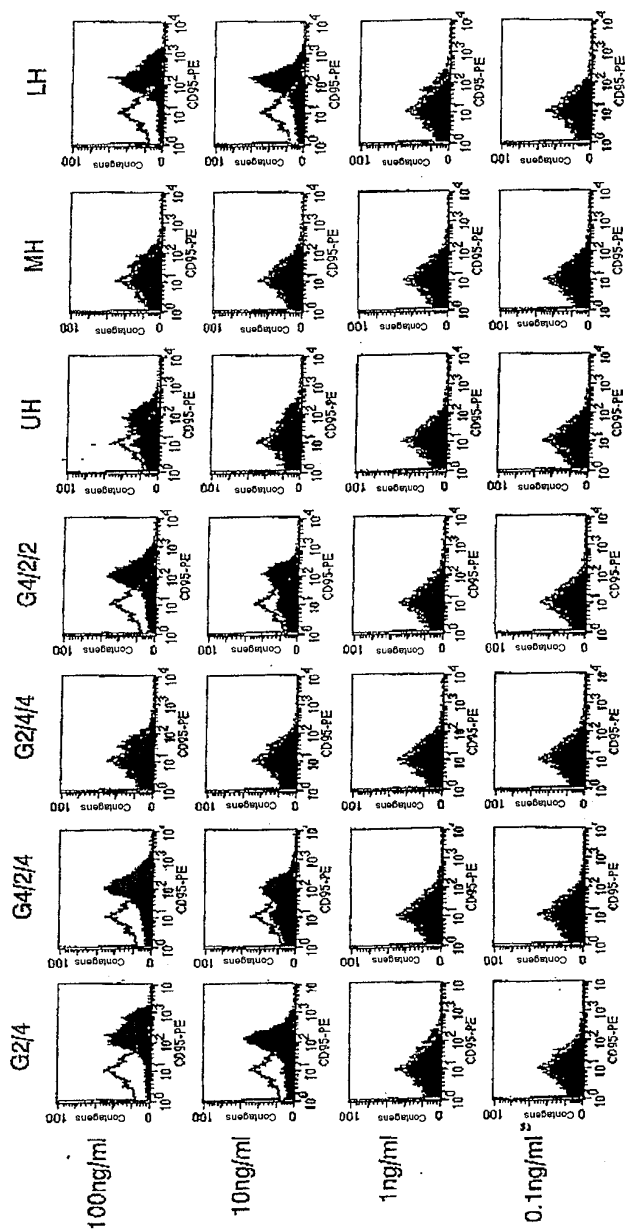


Fig. 7A

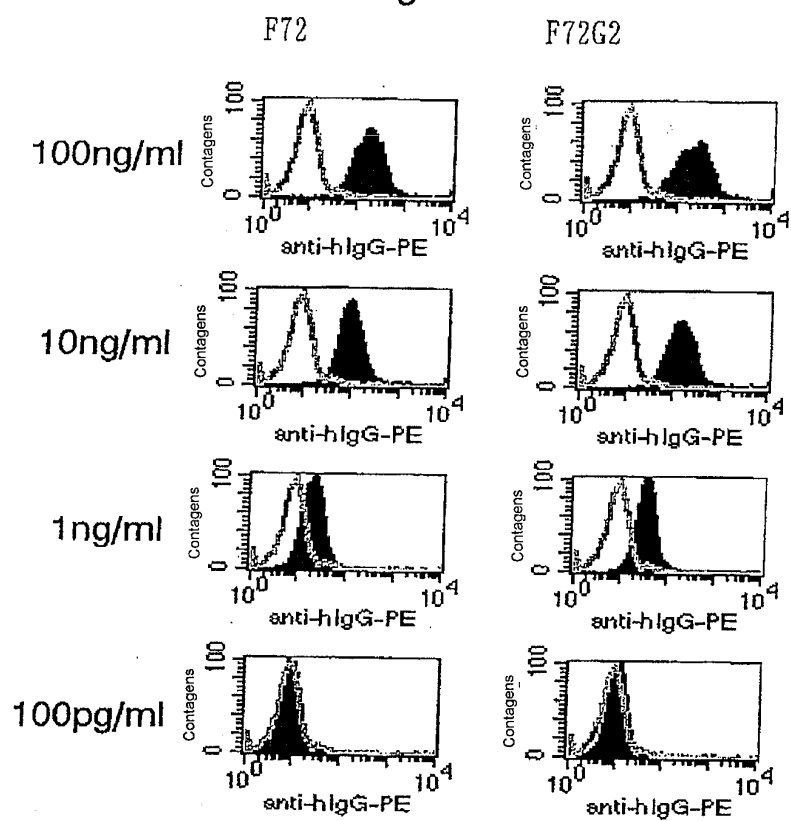


Fig. 7B

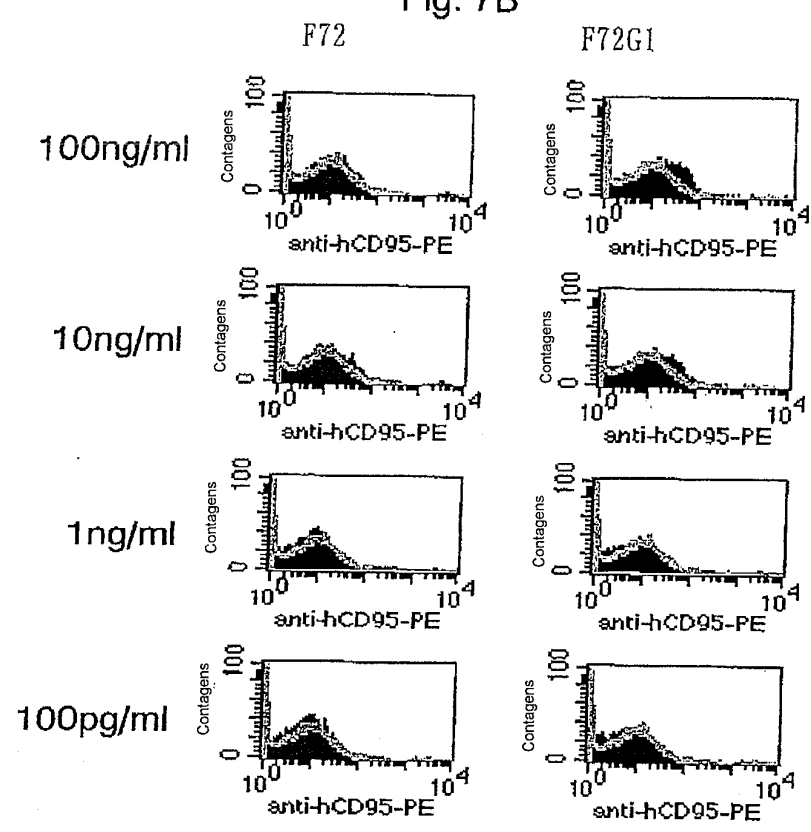


Fig. 8A

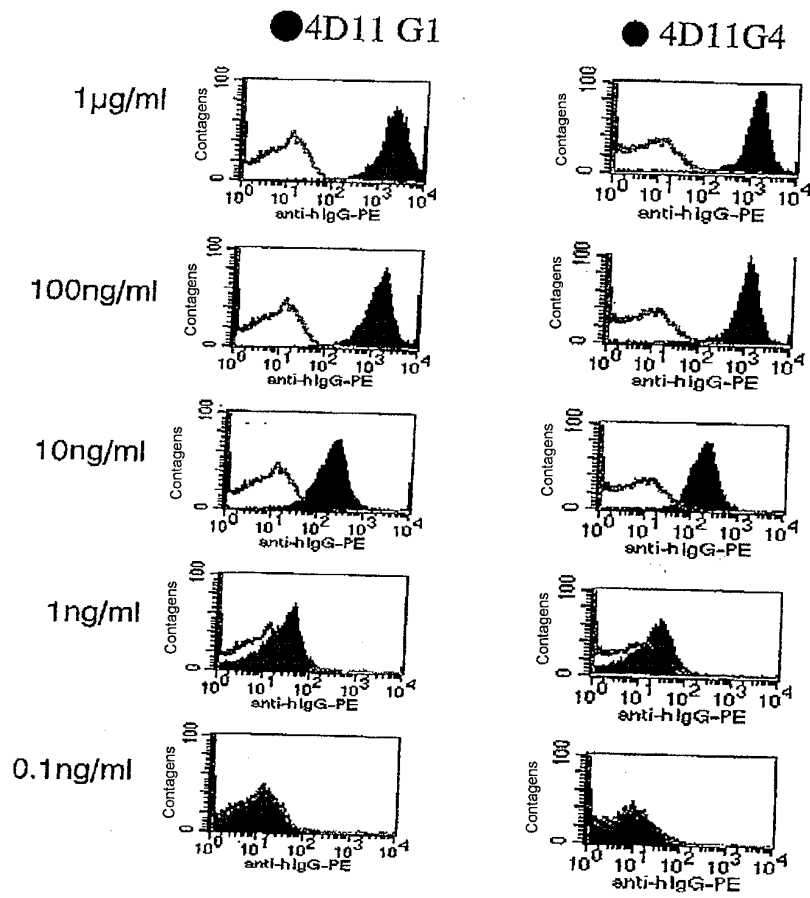
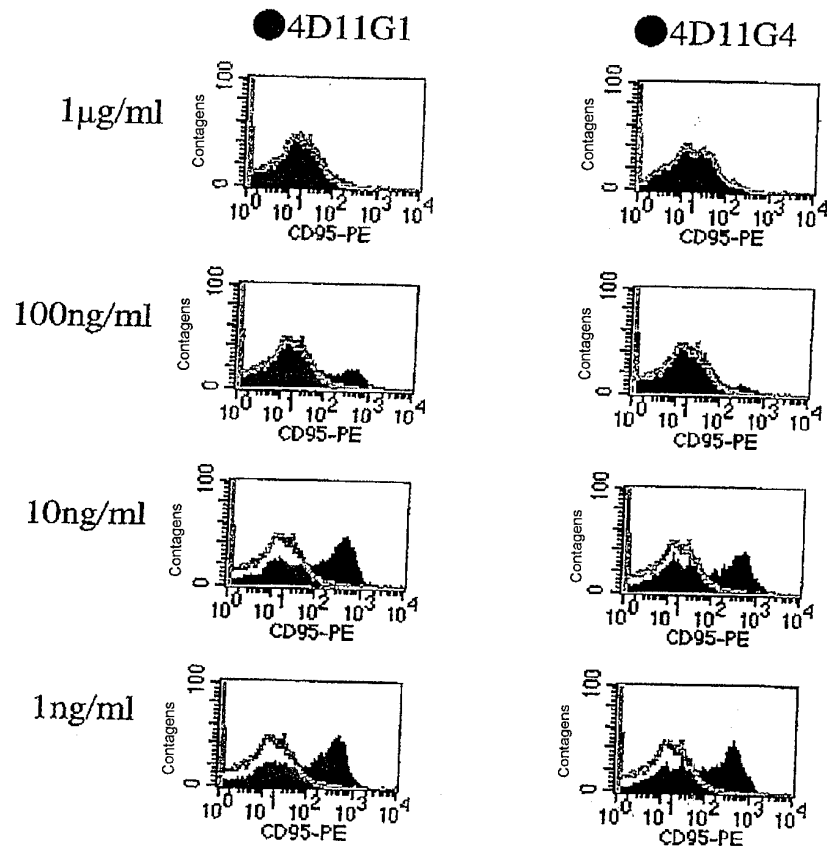
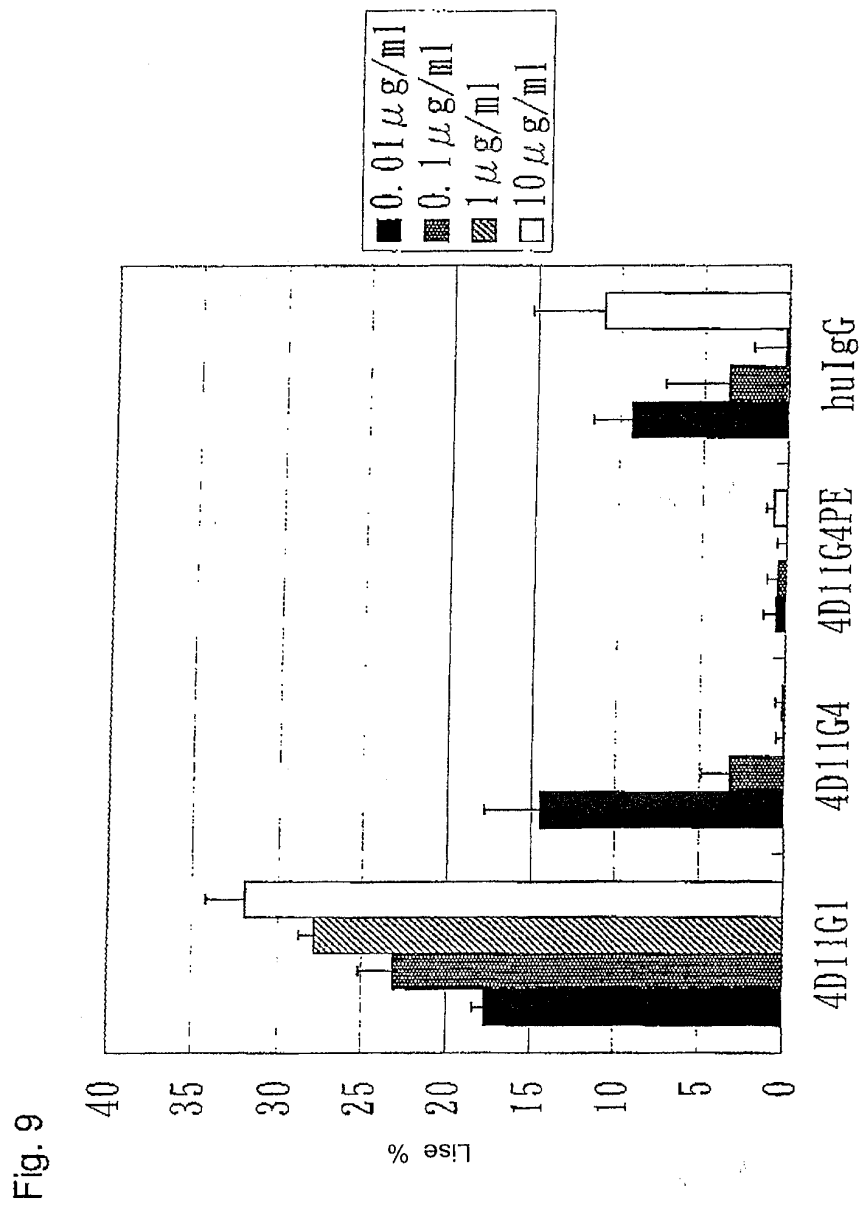
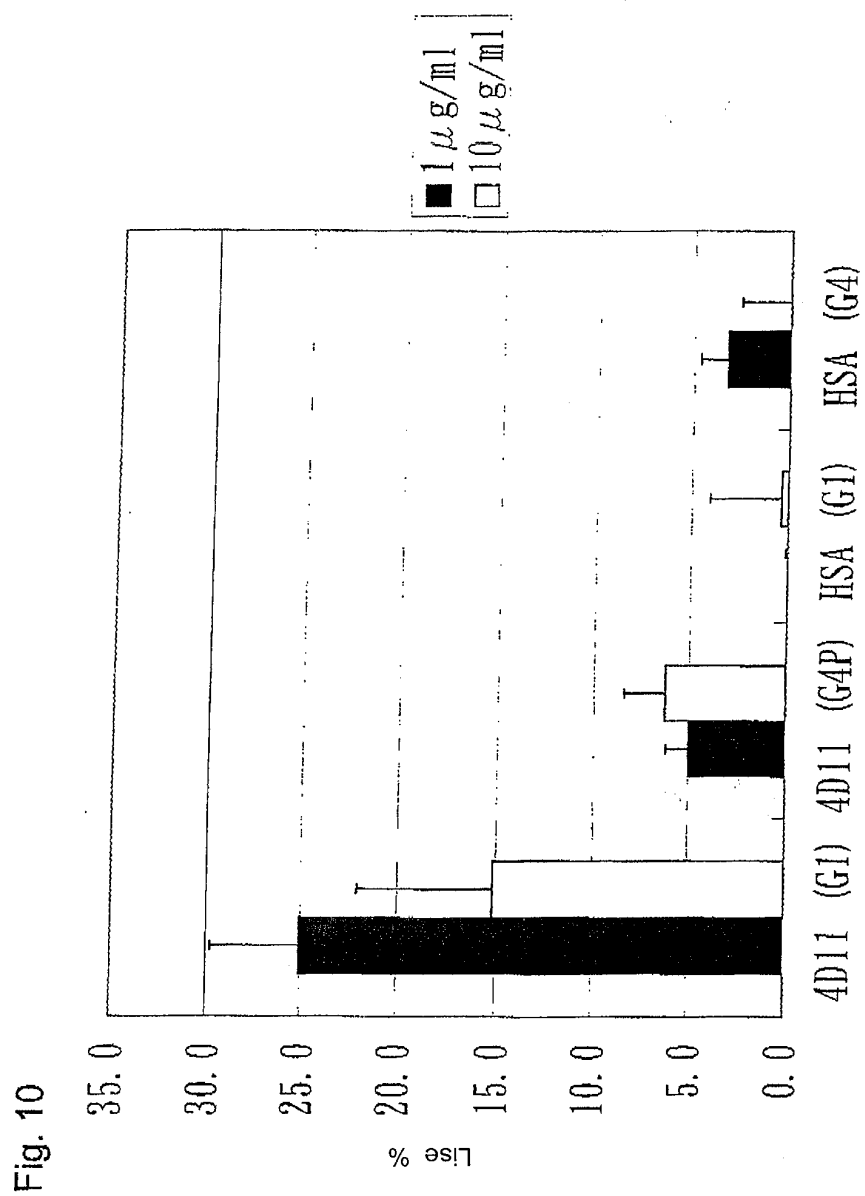


Fig. 8B







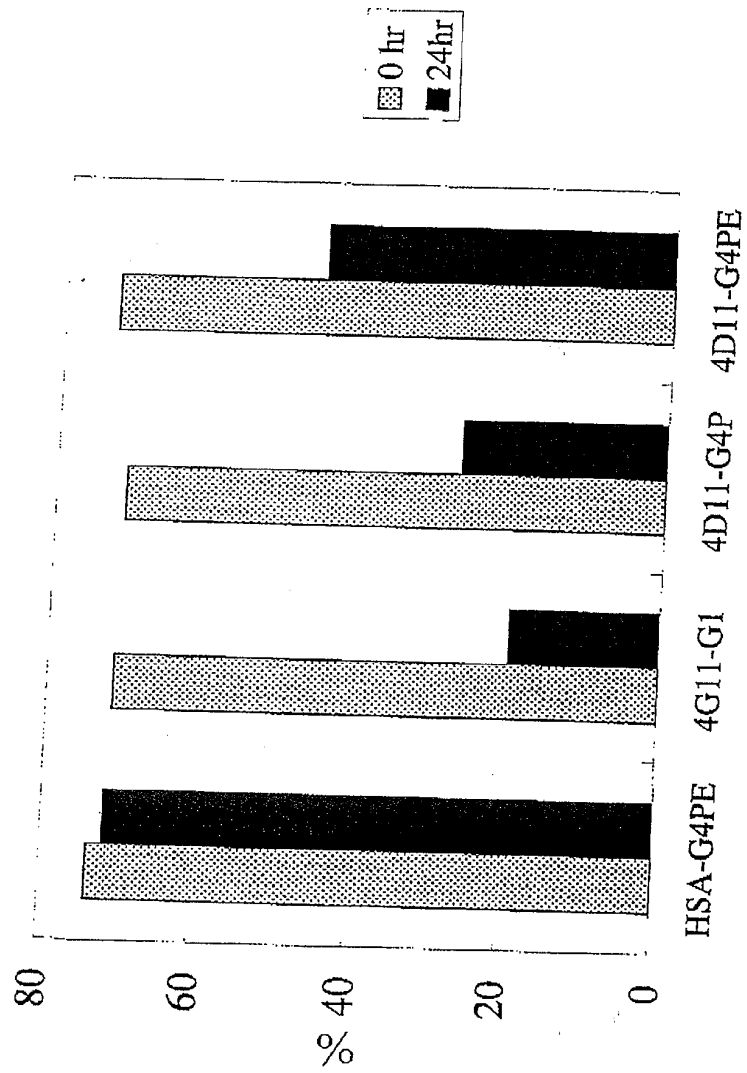


Fig. 11

11-1

Fig. 12A

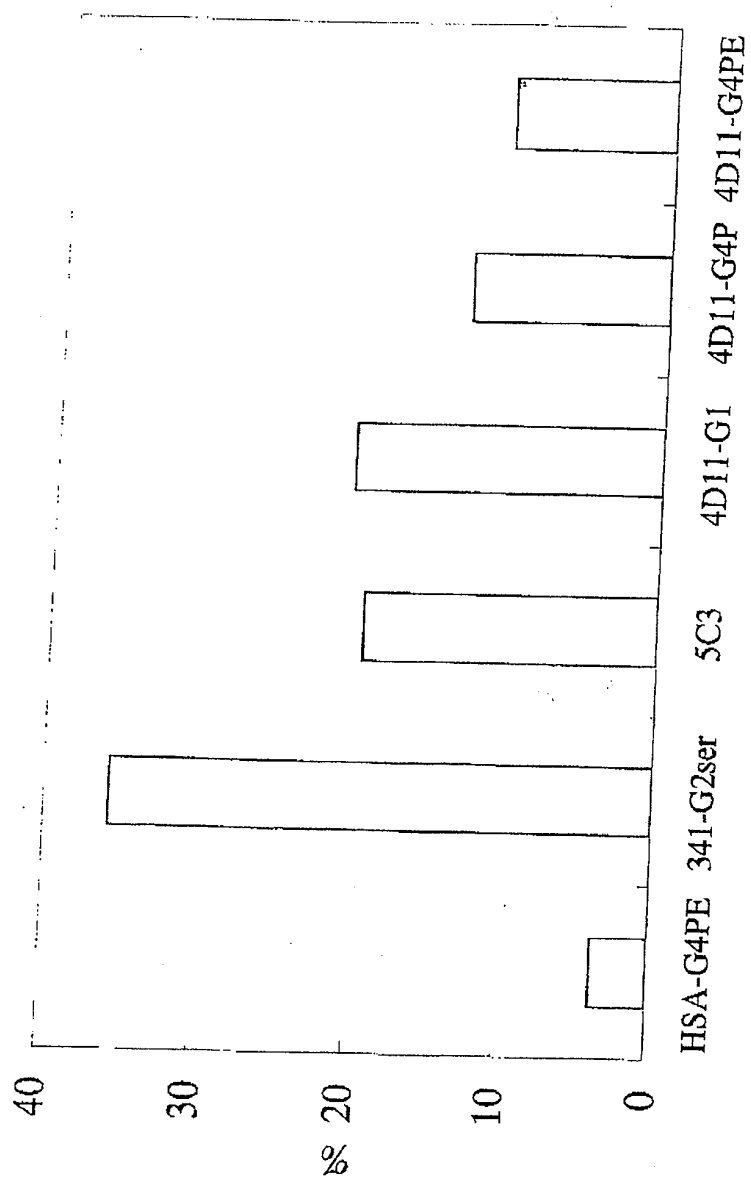


Fig. 12B

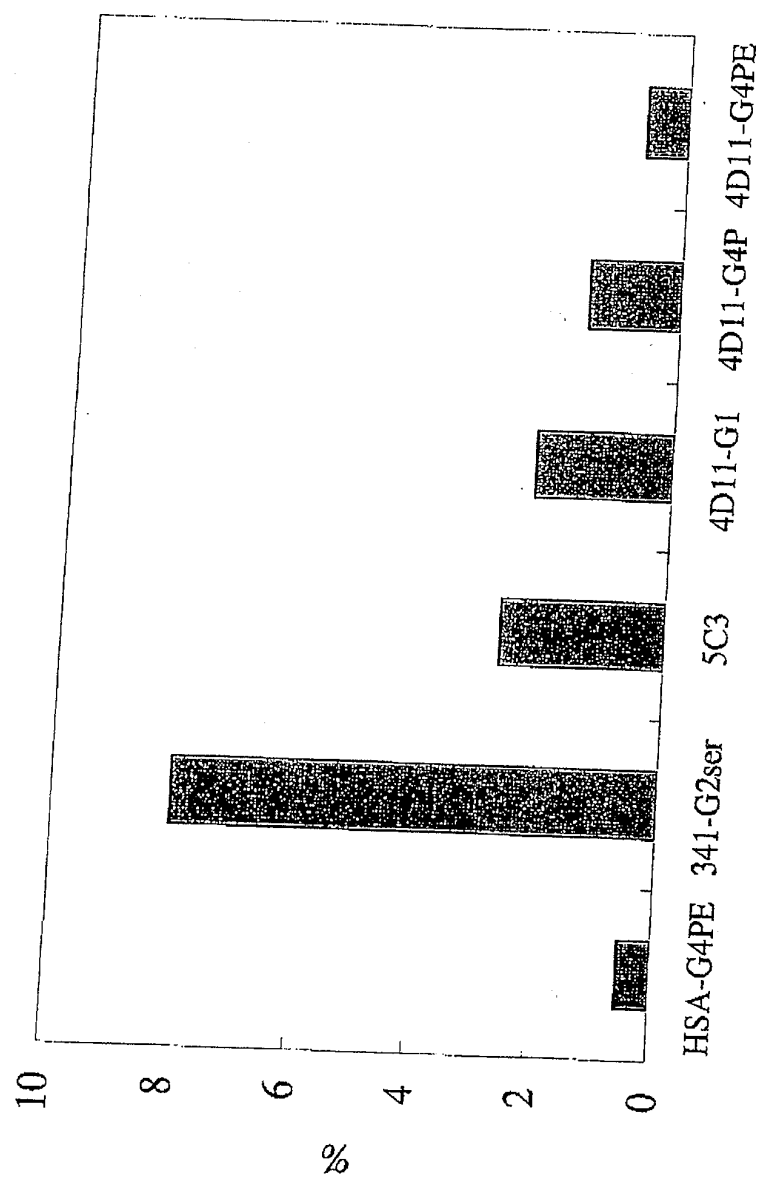
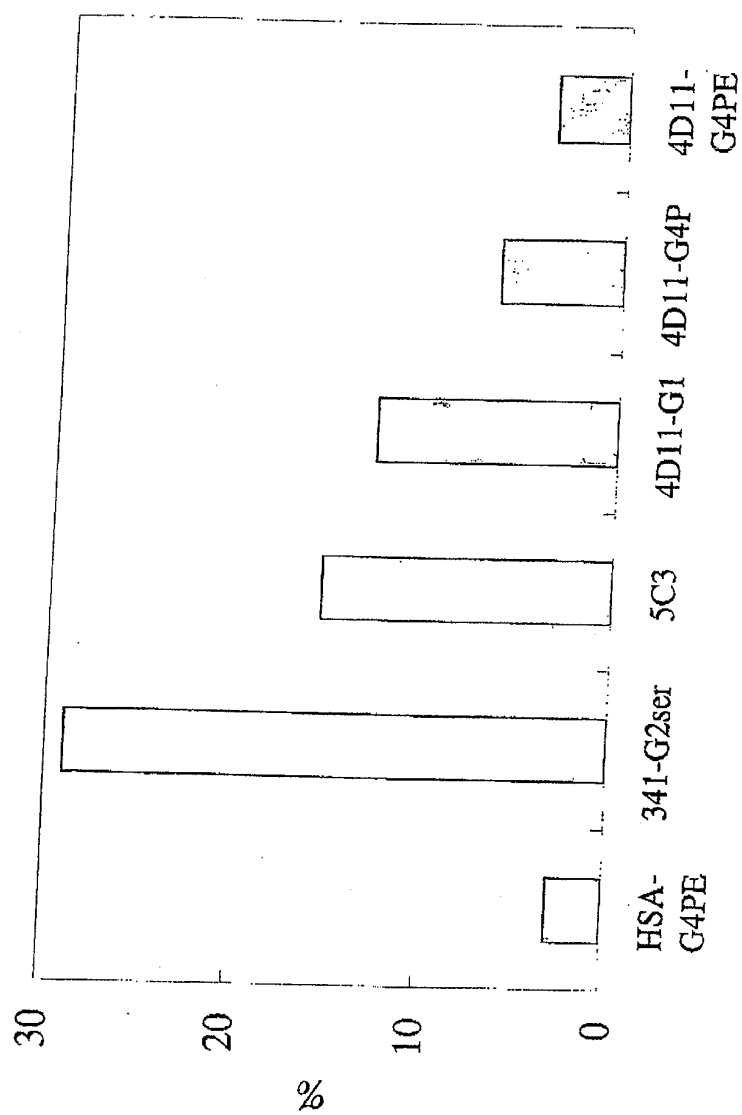


Fig. 12C



177

30/46

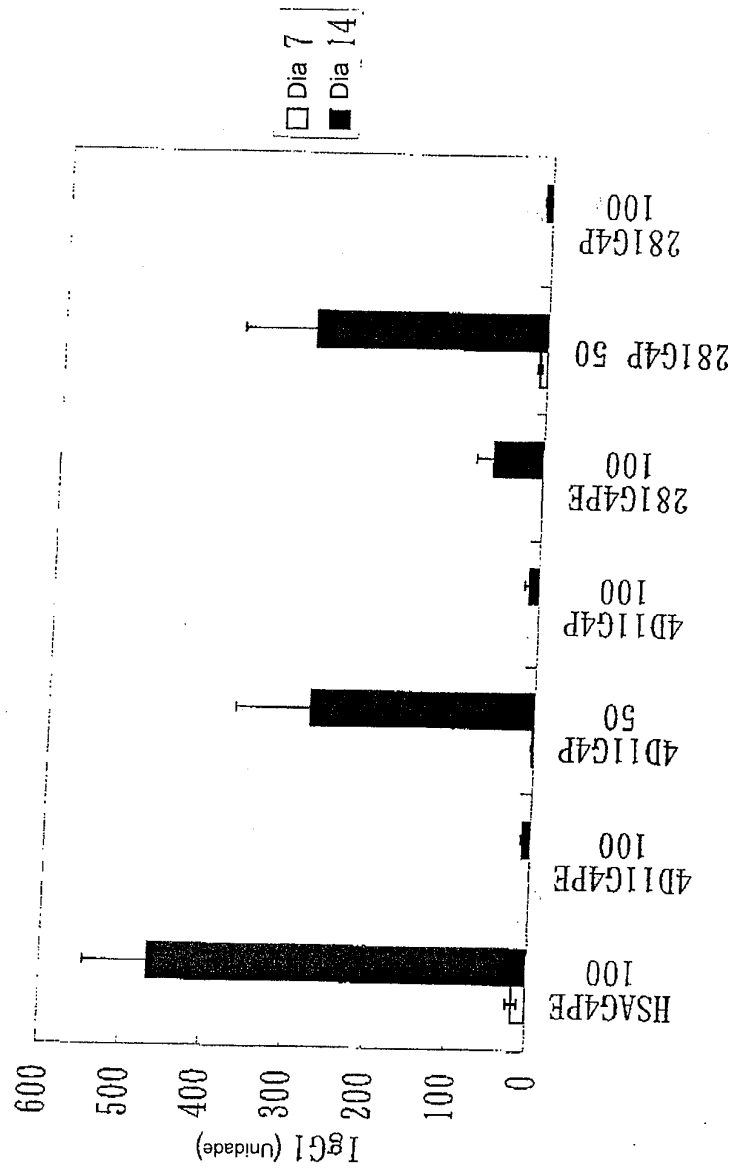


Fig. 13A

178

31/46

Fig. 13B

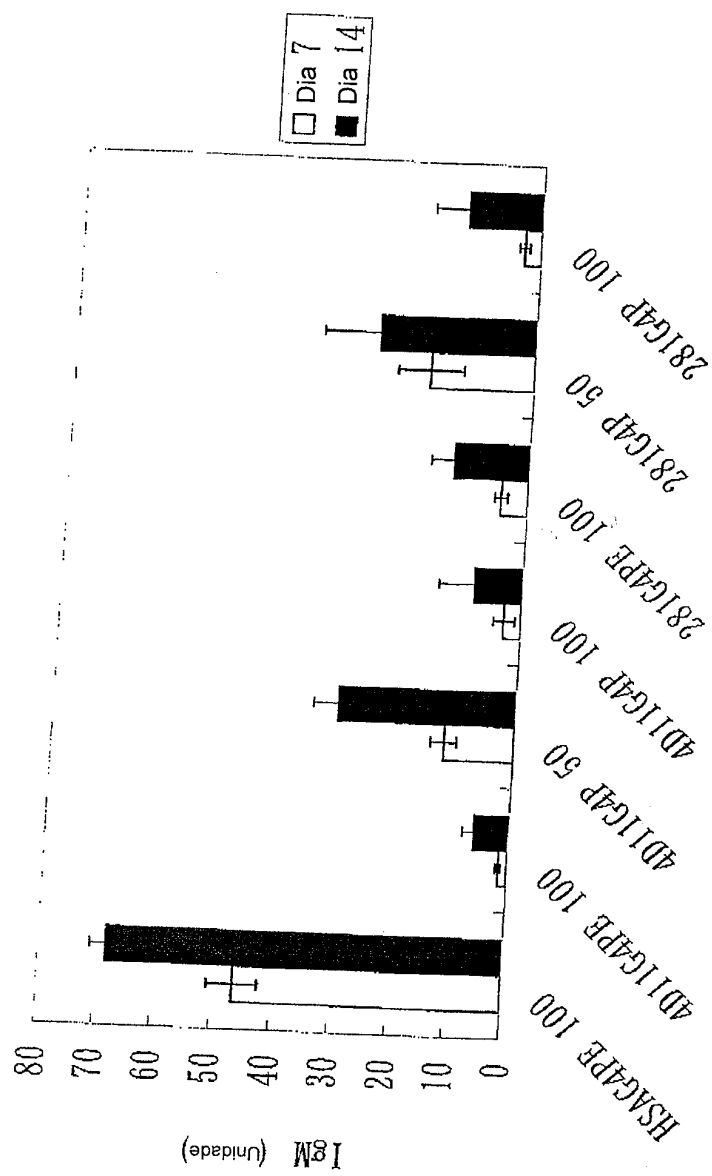
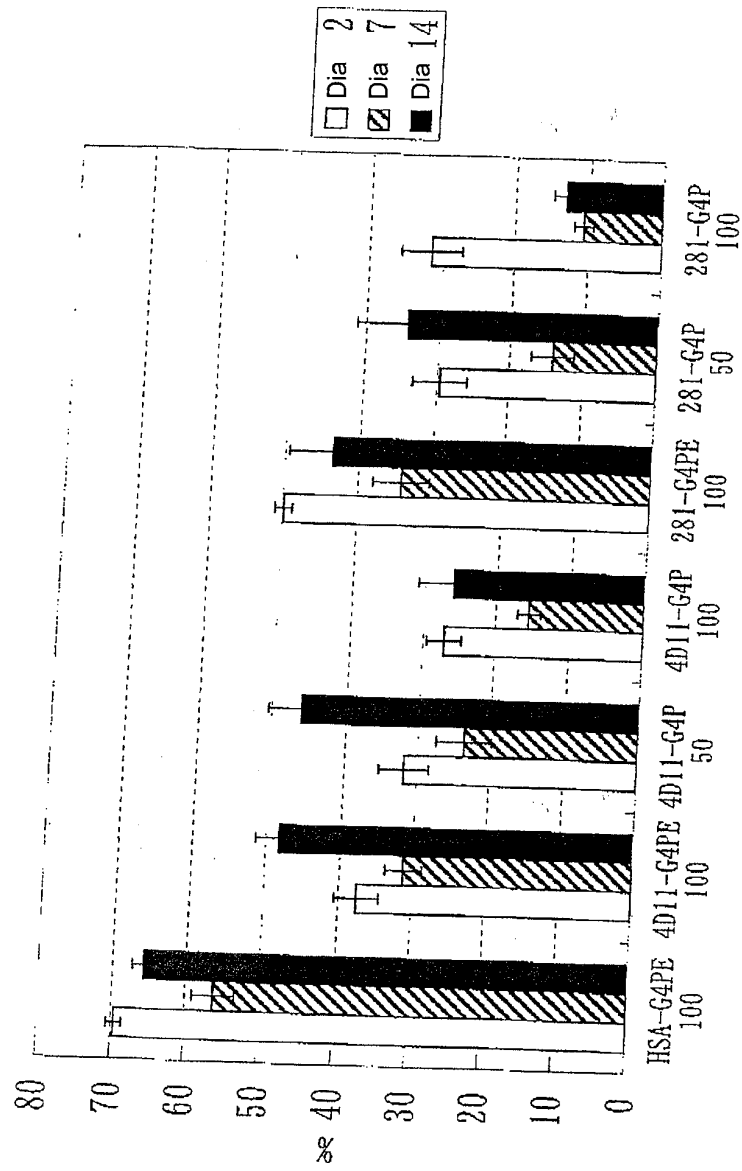
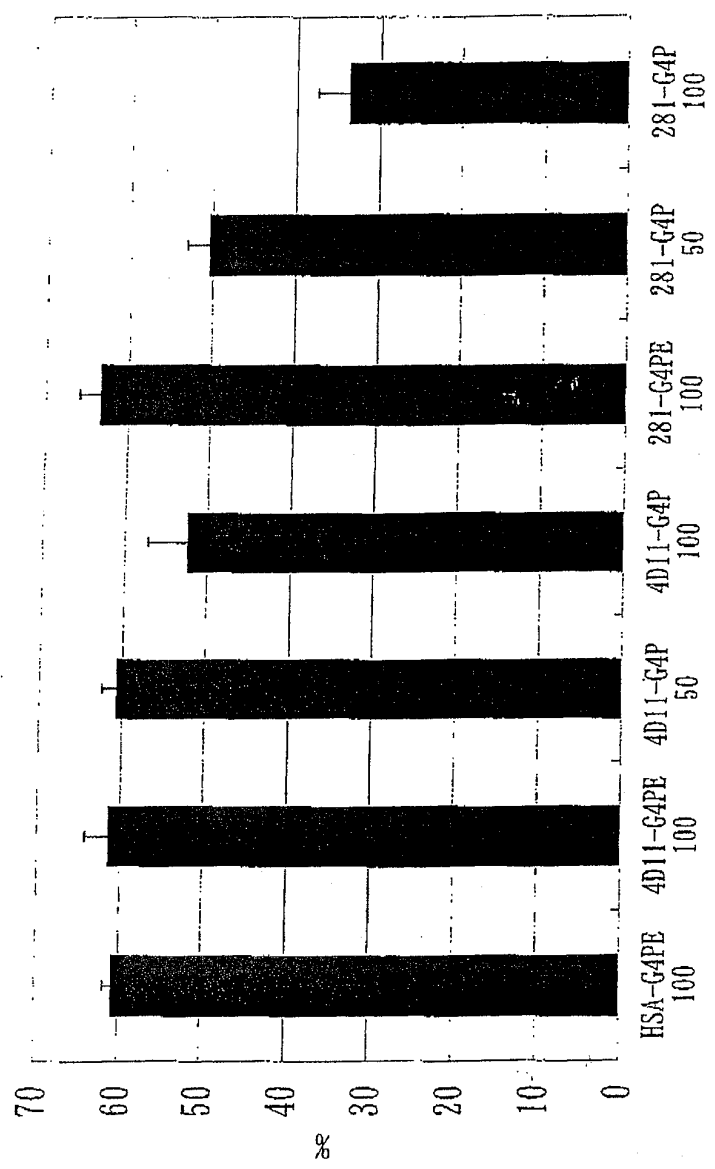


Fig. 14A



180

Fig. 14B



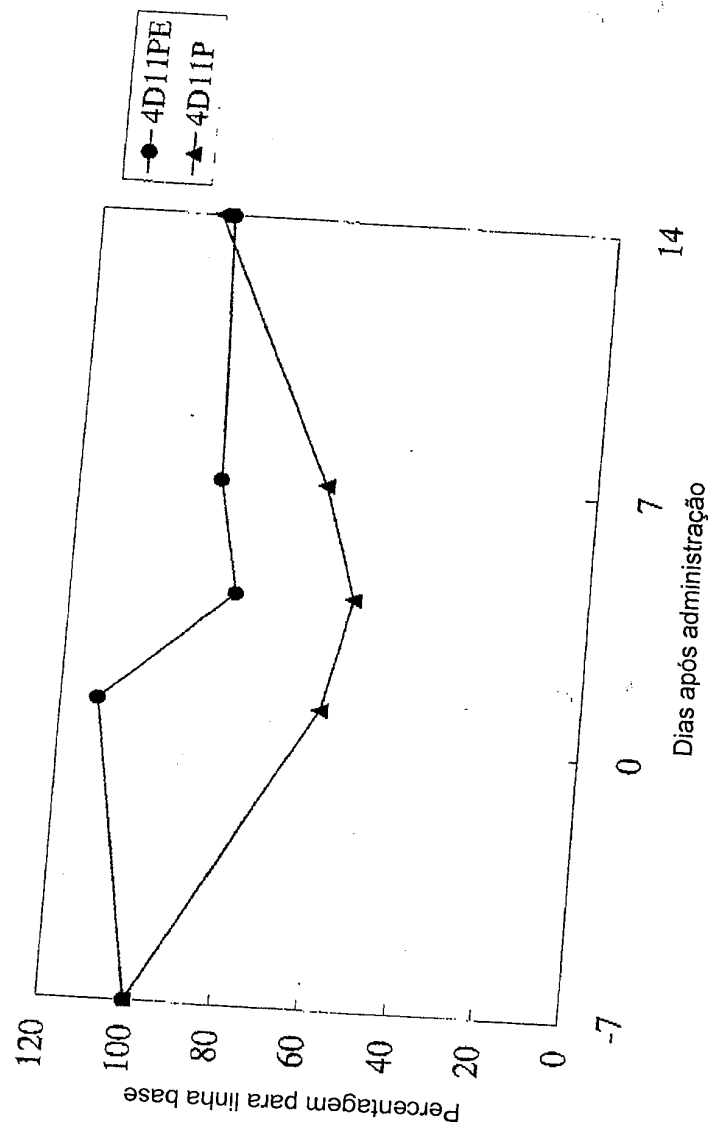


Fig. 15

Fig. 16

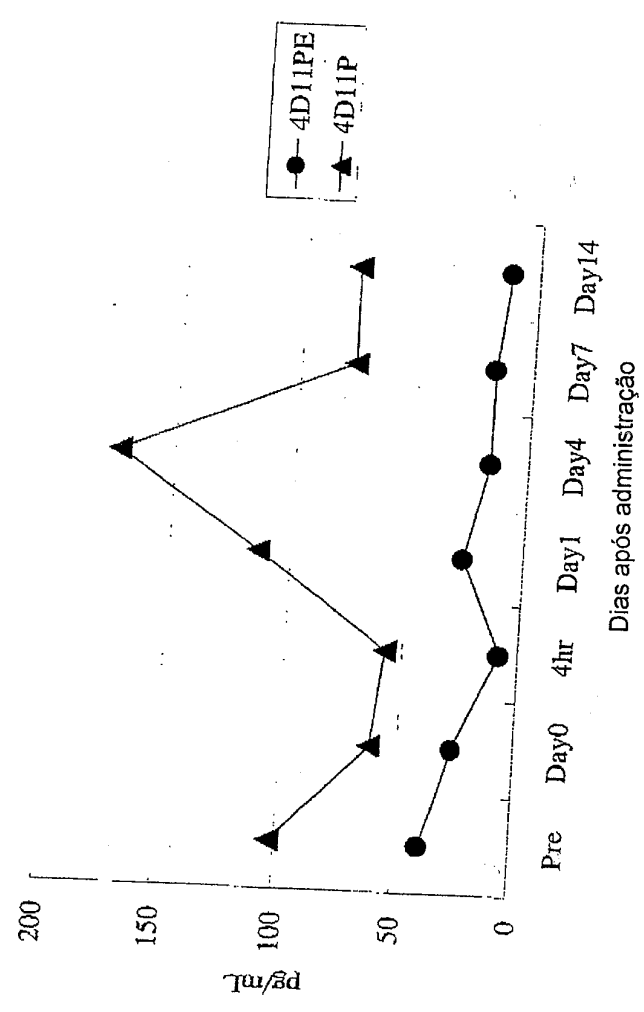


Fig. 17

Tratamento				Pontuação média	
Grupo (mg/kg)	Toxóide de tétano Sensibilização Intradérmico dorsal	Intramuscular	Desafio intradérmico abdominal	24 hrs**	48 hrs**
Controle	10 µL/Sítio x 12 Sítios	0.6 mL/animal	0 Lf/mL 1 Lf/mL 3 Lf/mL 10 Lf/mL	0.00 1.67 3.00 3.33	0.00 1.00 2.67 3.00
4D11 1 (mg/kg)	10 µL/Sítio x 12 Sítios	0.6 mL/animal	0 Lf/mL 1 Lf/mL 3 Lf/mL 10 Lf/mL	0.00 0.67 1.00 1.00	0.00 0.67 0.67 1.00
4D11 10 (mg/kg)	10 µL/Sítio x 12 Sítios	0.6 mL/animal	0 Lf/mL 1 Lf/mL 3 Lf/mL 10 Lf/mL	0.00 0.00 0.67 1.00	0.00 0.00 0.33 0.67

Observações: * marcador de resposta
formação de eritema e/ou escara
ausência de eritema
eritema muito leve (quase imperceptível):
eritema bem definido
de eritema moderado a grave:
** tempo após desafio

Formação de edema
ausência de edema
:0
edema muito leve (quase imperceptível)
:1
edema leve (bordas de área bem definidas por elevação definida :2
edema moderado (elevado a cerca de 1 mm)
:3
edema grave (elevado a 1 mm ou mais e estendendo-se além da
:4
área de exposição:

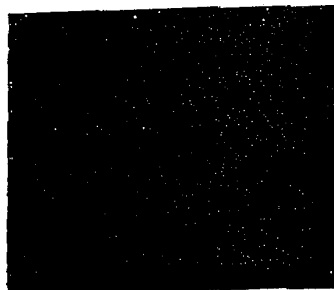
Fig. 18

Grupo	Animal No.	pre	(Taxa de diluição mínima para efeito positivo) Dias após a primeira dose									
			4	7	11	14	18	21	23			
Controle	1	0	200	0	12800	102400	204800	204800	204800			
	2	0	0	0	6400	25600	51200	51200	51200			
	3	0	0	0	6400	12800	25600	25600	25600			
	Média	0	67	0	8533	46933	93867	93867	93867			
1 (mg/kg)	S.D.	0	115	0	3695	48460	96920	96920	96920			
	4	0	0	0	200	1600	12800	12800	12800			
	5	0	0	0	200	400	6400	6400	6400			
	6	0	0	0	400	3200	6400	6400	6400			
10 (mg/kg)	Média	0	0	0	267	1733	8533	8533	8533			
	S.D.	0	0	0	115	1405	3695	3695	3695			
	7	0	0	0	0	0	0	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0	0	0			
10 (mg/kg)	9	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Média	0	0	0	0	0	0	0	0			
	S.D.	0	0	0	0	0	0	0	0			
	10	0	0	0	0	0	0	0	0			

39/46

Fig. 20A

Controle humano IgG4



Anticorpo anti-CD40 (4D11)



Controle murino IgG2



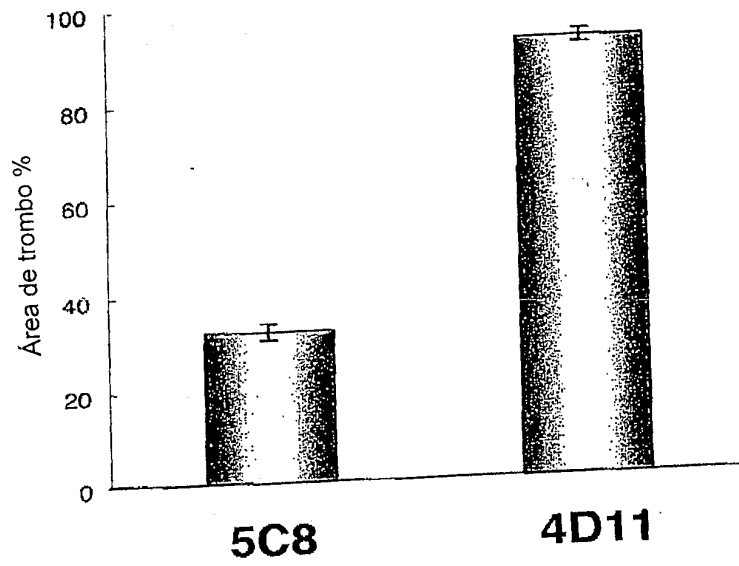
Anticorpo anti-CD40L (5C8)



187

40/46

Fig. 20B



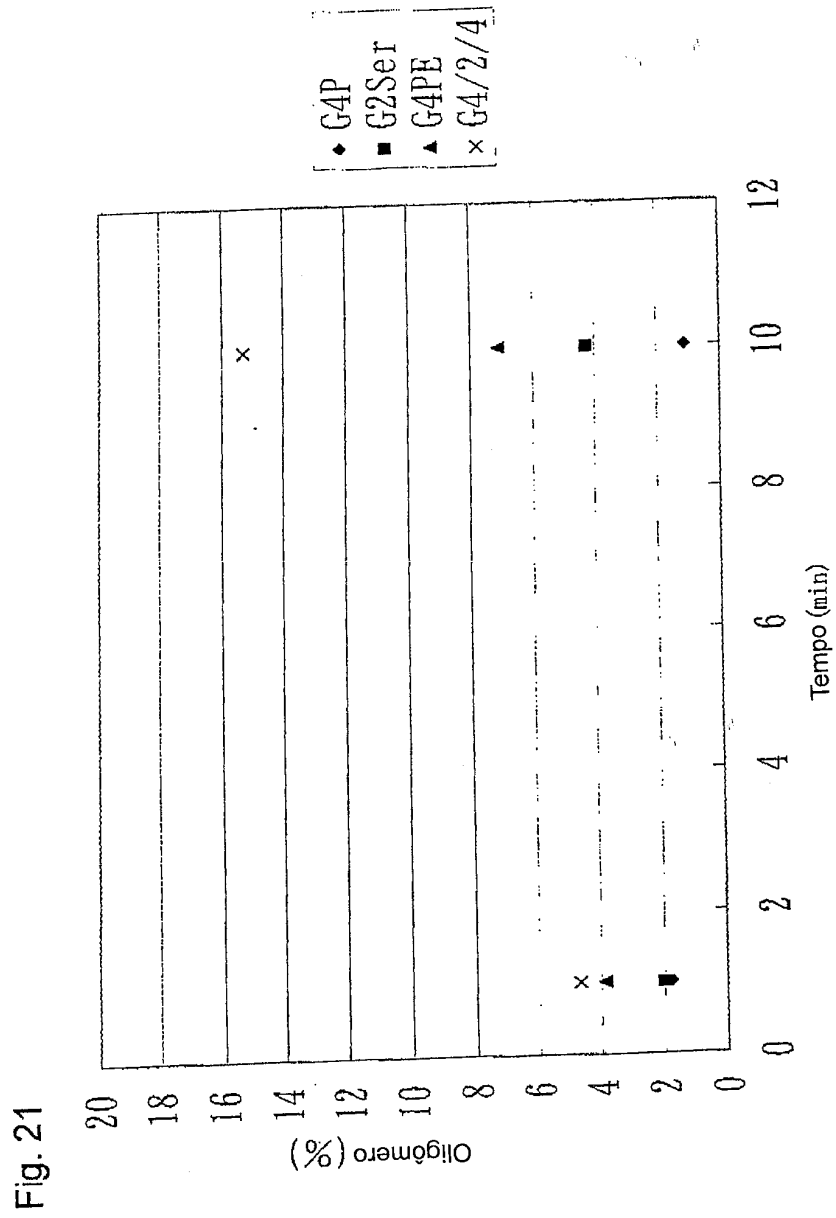
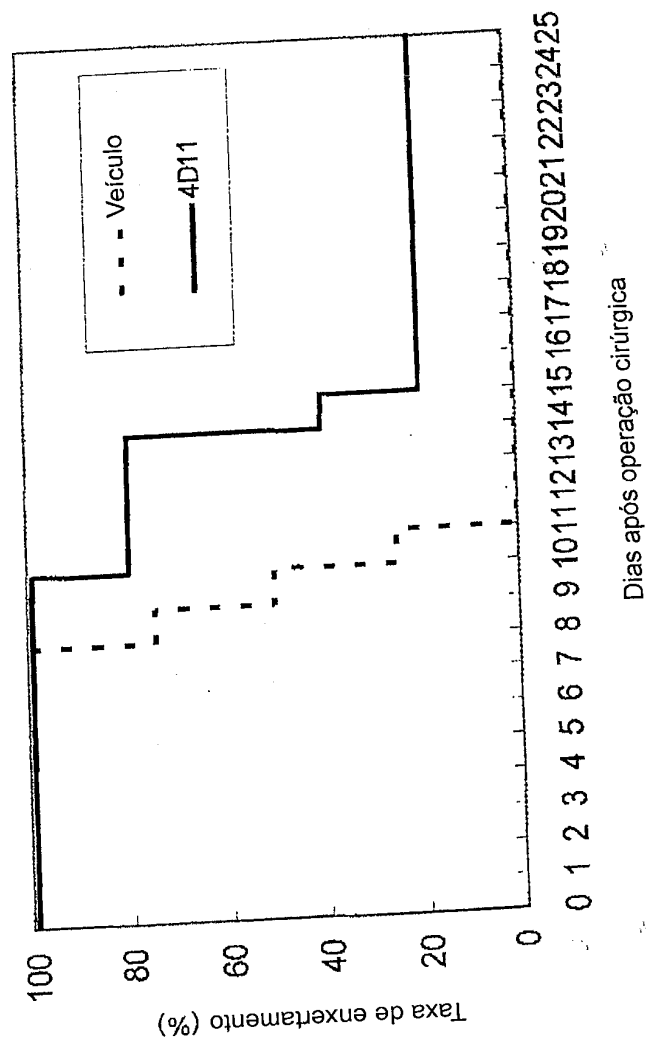


Fig. 22



189

43/46

Fig. 23

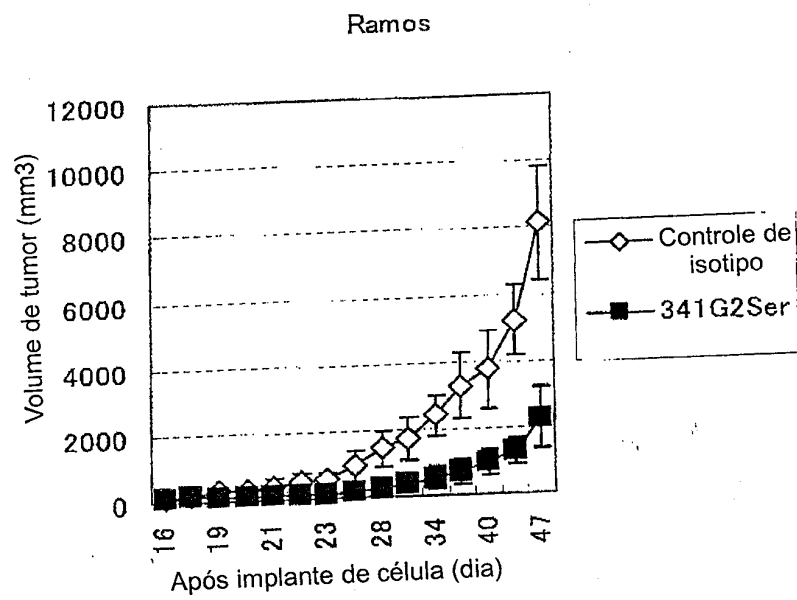
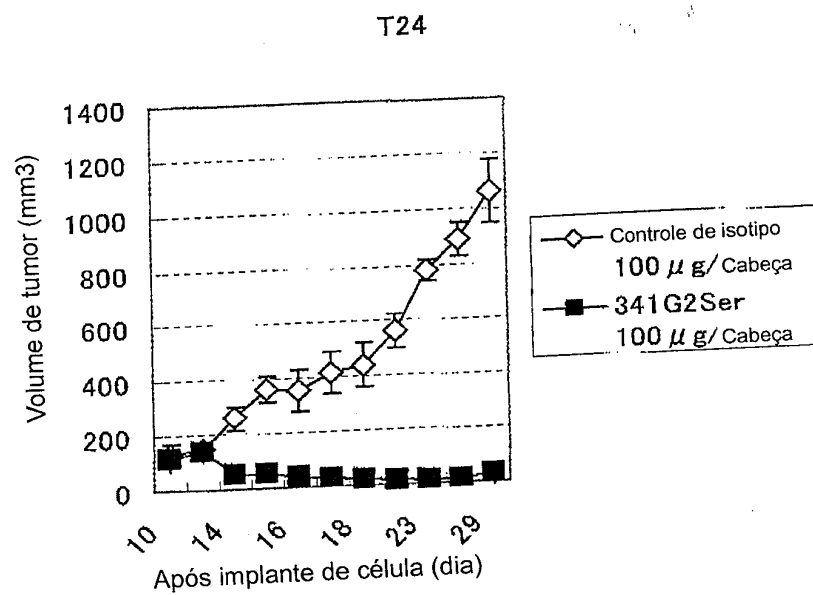


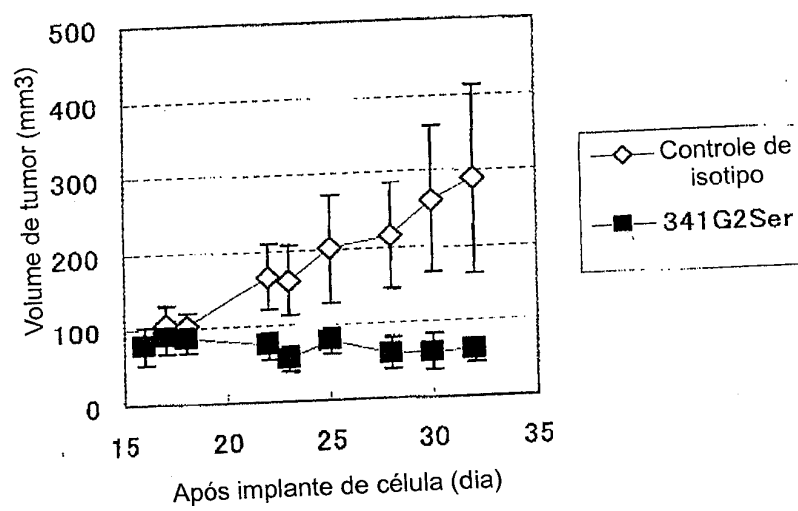
Fig. 24



45/46

Fig. 25

Hs 766T



46/46

Fig. 26

