

(22) Data de pedido: **2002.11.08**

(30) Prioridade(s): **2001.11.09 US 348980 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.11.17**

(45) Data e BPI da concessão: **2013.07.31**
211/2013

(73) Titular(es):

PFIZER PRODUCTS INC.

EASTERN POINT ROAD GROTON, CT 06340 US

AMGEN FREMONT INC.

US

(72) Inventor(es):

JOSE CORVALAN

US

VAHE BEDIAN

US

RONALD P. GLADUE

US

XIAO-CHI JIA

US

XIAO FENG

US

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA

AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-CD40**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A ANTICORPOS E PORÇÕES DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO DOS MESMOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A CD40, PREFERENTEMENTE CD40 HUMANO, E QUE FUNCIONAM COMO AGONISTAS DE CD40. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A ANTICORPOS ANTI-CD40 HUMANOS E PORÇÕES DE LIGAÇÃO A ANTIGÉNIO DOS MESMOS. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A ANTICORPOS QUE SÃO ANTICORPOS DE CADEIA SIMPLES, QUIMÉRICOS, BIESPECÍFICOS, DERIVATIZADOS OU PORÇÕES DE PROTEÍNAS DE FUSÃO. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A IMUNOGLOBULINAS DE CADEIA LEVE E PESADA ISOLADAS DERIVADAS A PARTIR DE ANTICORPOS ANTI-CD40 HUMANOS E MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM TAIS IMUNOGLOBULINAS. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE A MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD40 HUMANOS, COMPOSIÇÕES QUE COMPREENDEM ESTES ANTICORPOS E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DOS ANTICORPOS E COMPOSIÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO. A INVENÇÃO TAMBÉM PROPORCIONA MÉTODOS DE TERAPÊUTICA GENÉTICA USANDO MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM AS MOLÉCULAS DE IMUNOGLOBULINA PESADA E/OU LEVE QUE COMPREENDEM OS ANTICORPOS ANTI-CD40 HUMANOS. A INVENÇÃO TAMBÉM SE REFERE AOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS QUE COMPREENDEM AS MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO DA PRESENTE INVENÇÃO.

RESUMO**"ANTICORPOS ANTI-CD40"**

A presente invenção refere-se a anticorpos e porções de ligação a antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a CD40, preferentemente CD40 humano, e que funcionam como agonistas de CD40. A invenção também se refere a anticorpos anti-CD40 humanos e porções de ligação a antígeno dos mesmos. A invenção também se refere a anticorpos que são anticorpos de cadeia simples, quiméricos, biespecíficos, derivatizados ou porções de proteínas de fusão. A invenção também se refere a imunoglobulinas de cadeia leve e pesada isoladas derivadas a partir de anticorpos anti-CD40 humanos e moléculas de ácido nucleico que codificam tais imunoglobulinas. A presente invenção também se refere a métodos de preparação de anticorpos anti-CD40 humanos, composições que compreendem estes anticorpos e métodos de utilização dos anticorpos e composições para o diagnóstico e tratamento. A invenção também proporciona métodos de terapêutica genética usando moléculas de ácido nucleico que codificam as moléculas de imunoglobulina pesada e/ou leve que compreendem os anticorpos anti-CD40 humanos. A invenção também se refere aos animais transgênicos que compreendem as moléculas de ácido nucleico da presente invenção.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI-CD40"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O antigénio de CD40 é uma glicoproteína de superfície celular de 50 kDa que pertence à família do Receptor de Factor de Necrose Tumoral (TNF-R) (Stamenkovic *et al.*, EMBO J. 8:1403-10 (1989)). O CD40 é expresso em muitos tipos de células normais e tumorais, incluindo linfócitos B, células dendríticas, monócitos, macrófagos, epitélio tímico, células endoteliais, fibroblastos, e células de músculo liso. (Paulie S. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 20:23-8 (1985); Banchereau J. *et al.*, Adv. Exp. Med. & Biol. 378:79-83 (1995); Alderson M.R. *et al.*, J. of Exp. Med. 178:669-74 (1993); Ruggiero G. *et al.*, J. of Immunol. 156:3737-46 (1996); Hollenbaugh D. *et al.*, J. of Exp. Med. 182:33-40 (1995); Yellin M. J. *et al.*, J. of Leukocyte Biol. 58:209-16 (1995); e Lazaar A. L. *et al.*, J. of Immunol. 161:3120-7 (1998)). O CD40 é expresso em todos os linfomas B e em 70 % de todos os tumores sólidos. Embora seja constitutivamente expresso, o CD40 é regulado positivamente em células apresentadoras de antigénio por meio de sinais de maturação, tais como LPS, IL- β , IFN- γ e GM-CSF.

A activação de CD40 desempenha um papel crítico na regulação de respostas imunes celulares e humorais. A apresentação de antigénio sem activação de CD40 pode levar a tolerância, enquanto que a sinalização de CD40 pode reverter tal tolerância, aumentar a apresentação de antigénio por todas as células apresentadoras de antigénio (APCs), levar a secreção de quimiocinas e citocinas auxiliares, aumentar a expressão e sinalização de moléculas co-estimuladoras, e estimular a actividade citolítica de células imunes.

O CD40 desempenha um papel crítico na proliferação, maturação e mudança de classe de células B. (Foy T. M. *et al.*, *Ann. Rev. of Immunol.* 14:591-617 (1996)). A disrupção da via de sinalização de CD40 leva a distribuição anormal de isotipo de imunoglobulina no soro, a falta de iniciação de célula T CD4+, e defeitos em respostas humorais secundárias. Por exemplo, a síndrome de hiper-IgM ligada a X é uma doença associada a uma mutação no gene CD40L humano, e é caracterizada pela incapacidade de indivíduos afectados de produzir anticorpos diferentes daqueles do isotipo IgM, indicando que a interacção produtiva entre CD40 e CD40L é requerida para uma resposta imune eficaz.

A união de CD40 pelo CD40L leva à associação do domínio citoplasmático CD40 com TRAFs (factores associados a TNF-R). (Lee H.H. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1421-6 (1999); Pullen S.S. *et al.*, *Biochemistry* 37:11836-45 (1998); Grammar A.C. *et al.*, *J. of Immunol.* 161:1183-93 (1998); Ishida T.K. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9437-42 (1996); Pullen S.S. *et al.*, *J. of Biol. Chem.* 274:14246-54 (1999)). A interacção com TRAFs pode culminar na activação de ambas as vias NFκB e Jun/AP1. (Tsukamoto N. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1234-9 (1999); Sutherland C.L. *et al.*, *J. of Immunol.* 162:4720-30 (1999)). Dependendo do tipo de célula, esta sinalização leva a secreção aumentada de citocinas tais como IL-6 (Jeppson J.D. *et al.*, *J. of Immunol.* 161:1738-42 (1998); Uejima Y. *et al.*, *Int. Arch. de Allergy & Immunol.* 110:225-32, (1996), IL-8 (Gruss H.J. *et al.*, *Blood* 84:2305-14 (1994); von Leoprechting A. *et al.*, *Cancer Res.* 59:1287-94 (1999); Denfeld RW. *et al.*, *Europ. J. of Immunol.* 26:2329-34 (1996)), IL-12 (Cella M. *et al.*, *J. of Exp. Med.* 184:747-52 (1996); Ferlin W.G. *et al.*, *Europ. J. of Immunol.* 28:525-31 (1998); Armant M. *et al.*, *Europ. J. of Immunol.* 26:1430-4 (1996); Koch F. *et al.*, *J. of Exp. Med.* 184:741-6 (1996); Seguin R. e L.H. Kasper, *J. of Infect.*

Diseases 179:467-74 (1999); Chaussabel D. *et al.*, Infection & Immunity 67:1929-34 (1999)), IL-15 (Kuniyoshi J.S. *et al.*, Cellular Immunol. 193:48-58 (1999)) e quimiocinas (MIP1 α , MIP1 β , RANTES, e outros) (McDyer J.F. *et al.*, J. of Immunol. 162:3711-7 (1999); Schaniel C. *et al.*, J. of Exp. Med. 188:451-63 (1998); Altenburg A. *et al.*, J. of Immunol. 162:4140-7 (1999); Deckers J.G. *et al.*, J. of the Am. Society of Nephrology 9:1187-93 (1998)), expressão aumentada de MHC de classe I e II (Santos-Argumedo L. *et al.*, Cellular Immunol. 156:272-85 (1994)), e expressão aumentada de moléculas de adesão (por exemplo, ICAM) (Lee H.H. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:1421-6 (1999); Grousson J. *et al.*, Archives of Dermatol. Res. 290:325-30 (1998); Katada Y. *et al.*, Europ. J. of Immunol. 26:192-200 (1996); Mayumi M. *et al.*, J. of Allergy & Clin. Immunol. 96:1136-44 (1995); Flores-Romo L. *et al.*, Immunol. 79:445-51 (1993)) e moléculas co-estimuladoras (por exemplo, B7) (Roy M. *et al.*, Europ. J. of Immunol. 25:596-603 (1995); Jones K.W. e C.J. Hackett, Cellular Immunol. 174:42-53 (1996); Caux C. *et al.*, Journal of Exp. Med. 180:1263-72 (1994); Kiener P.A. *et al.*, J. of Immunol. 155:4917-25 (1995)). Citocinas induzidas por união de CD40 aumentam a sobrevivência e activação de células T.

Além do aumento de função celular e imune, os efeitos da activação de CD40 incluem: recrutamento de células e diferenciação por quimiocinas e citocinas; activação de monócitos; actividade citolítica aumentada de linfócito T citolítico (CTL) e células assassinas naturais (NK); indução de apoptose em tumores CD40 positivos; aumento de imunogenicidade de tumores CD40 positivos; e produção de anticorpos específicos a tumor. O papel de activação de CD40 em respostas imunes mediadas por célula está também bem estabelecido, e é revisto em: Grewal *et al.*, Ann. Rev. of Immunol. 16:111-35 (1998); Mackey *et al.*, J. of Leukocyte Biol. 63:418-28 (1998); e Noelle R.J., Agents &

Actions - Supl. 49:17-22 (1998).

Os estudos usando um sistema de modelo de iniciação cruzada mostrou que a activação de CD40 de APCs pode substituir o requisito de célula T auxiliar para a geração de linfócito T citolítico (CTL). (Bennett *et al.*, Nature 393:478-480 (1998)). Evidência de ratinhos deficientes em CD40L indica um claro requisito para a sinalização de CD40 na iniciação de célula T auxiliar. (Grewal I.S. *et al.*, Science 273:1864-7 (1996); Grewal I.S. *et al.*, Nature 378:617-20 (1995)). A activação de CD40 converte células B que possuem antigénio de outro modo tolerogénicas, em APCs competentes. (Buhlmann J.E. *et al.*, Immunity 2:645-53 (1995)). A activação de CD40 induz a maturação e diferenciação de progenitores do sangue do cordão em células dendríticas. (Flores-Romo L. *et al.*, J. of Exp. Med. 185:341-9 (1997); Mackey M.F. *et al.*, J. of Immunol. 161:2094-8 (1998)). A activação de CD40 também induz a diferenciação de monócitos em células dendríticas funcionais. (Brossart P. *et al.*, Blood 92:4238-47 (1998)). Além disso, a activação de CD40 aumenta a actividade citolítica de células NK através de citocinas induzidas por APC-CD40. (Carbone E. *et al.*, J. of Exp. Med. 185: 2053-60 (1997); Martin-Fontecha A. *et al.*, J. of Immunol. 162:5910-6 (1999)). Estas observações indicam que CD40 desempenha um papel essencial na iniciação e aumento de respostas imunes por meio da indução de maturação de APCs, secreção de citocinas auxiliares, regulação positiva de moléculas co-estimuladoras, e aumento de funções efectoras.

O papel crítico de sinalização de CD40 na iniciação e maturação de respostas imunes citotóxicas e humorais torna este sistema um alvo ideal para o aumento imune. Tal aumento pode ser particularmente importante para montar respostas imunes eficazes a antigénios tumorais, que são apresentados geralmente ao sistema imune através de iniciação cruzada de APCs activadas. (Huang A.Y. *et al.*,

Ciba Foundation Symp. 187:229-44 (1994); Toes R.E.M. et al., Seminars in Immunol. 10:443-8 (1998); Albert M.L. et al., Nature 392:86-9 (1998); Bennett S.R et al., J. of Exp. Med. 186:65-70 (1997)).

Diversos grupos têm demonstrado a eficácia da activação de CD40 for respostas anti-tumorais *in vitro* e *in vivo*. (Toes R.E.M. et al., Seminars in Immunol. 10:443-8 (1998)). Dois grupos, usando modelo metastático de pulmão de carcinoma de célula renal e tumores subcutâneos por células transformadas de maneira viral, têm independentemente demonstrado que a activação de CD40 pode reverter a tolerância a antígenos específicos a tumor, tendo como resultado uma iniciação anti-tumoral eficiente de células T. (Sotomayor E.M. et al., Nature Medicine 5:780-787 (1999); Diehl L. et al., Nature Medicine 5:774-9 (1999)). A actividade anti-tumoral na ausência de células imunes foi também relatada por tratamento com anticorpo anti-CD40 e CD40L num modelo de linha de cancro de mama humano em ratinhos SCID. (Hirano A. et al., Blood 93:2999-3007 (1999)). A activação de CD40 por anticorpo anti-CD40 mostrou-se recentemente que erradica linfoma CD40+ e CD40- em modelos de ratinho. (French R.R. et al., Nature Medicine 5:548-53 (1999)). Além disso, estudos anteriores por Glennie e colaboradores concluem que a actividade de sinalização por anticorpos anti-CD40 é mais eficaz para induzir a depuração de tumor *in vivo* que outros anticorpos anti-marcador de superfície capazes de recrutar efectores. (Tutt A.L. et al., J. of Immunol. 161:3176-85 (1998)). Consistente com estas observações, quando anticorpos anti-CD40 foram testados para actividade contra células tumorais de CD40+ *in vivo*, a maioria, mas não toda a actividade tumoricida foi associada à sinalização de CD40 ao invés de ADCC. (Funakoshi S. et al., J. of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunol. 19:93-101 (1996)). Em outro estudo, células dendríticas da medula óssea foram tratadas

ex vivo com uma variedade de agentes, e testadas para actividade anti-tumoral *in vivo*. Estes estudos demonstraram que DCs estimuladas por CD40L foram as células mais maduras e mais eficazes que montam uma resposta anti-tumoral.

O papel essencial de CD40 na imunidade anti-tumoral foi também demonstrado por meio da comparação de respostas de ratinhos do tipo selvagem e CD40^{-/-} a vacinas de tumor. Estes estudos mostram que ratinhos CD40^{-/-} são incapazes de alcançar a imunidade de tumor observada em ratinhos normais. (Mackey M.F. *et al.*, Cancer Research 57:2569-74 (1997)). Em outro estudo, esplenócitos de ratinhos com tumor foram estimulados com células tumorais e tratados com anticorpos anti-CD40 de activação *ex vivo*, e mostraram ter actividade aumentada de CTL específica a tumor. (Donepudi M. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 48:153-164 (1999)). Estes estudos demonstram que CD40 ocupa uma posição crítica na imunidade anti-tumoral, em ambos tumores CD40 positivos e negativos. Uma vez que CD40 é expresso em linfomas, leucemias, mieloma múltiplo, uma maior parte de carcinomas de nasofaringe, bexiga, ovário, e fígado, e alguns cancros de mama e colo-rectal, a activação de CD40 pode ter uma ampla série de aplicações clínicas.

Os anticorpos monoclonais de activação anti-CD40 podem contribuir à erradicação de tumor via diversos mecanismos importantes. Em primeiro lugar entre estes está a activação de células dendríticas hospedeiras para processamento e apresentação de antígeno a tumor melhorados, bem como apresentação de antígeno ou imunogenicidade aumentada de células tumorais CD40 positivas por si mesmas, levando a activação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ específicos a tumor. Actividade anti-tumoral adicional pode ser mediada por outros efeitos de aumento imune de sinalização de CD40 (produção de quimiocinas e citocinas, recrutamento e activação de monócitos, e actividade citolítica aumentada CTL e NK), bem como destruição directa de tumores CD40⁺ por

indução de apoptose ou por meio da estimulação de uma resposta humoral levando a ADCC. Células tumorais que estão a morrer e apoptóticas podem também se tornar uma importante fonte de antígenos específicos a tumor que são processados e apresentados por APCs activadas por CD40. Consequentemente, existe uma necessidade crítica de anticorpos agonistas anti-CD40 terapêuticos, clinicamente relevantes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A-1H são alinhamentos de sequência de sequências de aminoácidos preditas de domínios variáveis de cadeia leve e pesada de anticorpo monoclonal anti-CD40 isolados com as sequências de aminoácidos de linha germinal dos genes de cadeia leve e pesada correspondentes). Diferenças entre os clones e a sequência de linha germinal são indicadas por sombreamento. As sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 de linha germinal estão sublinhadas. Em alinhamentos de sequências de cadeia pesada, inserções aparentes à região CDR3 são indicadas por um traço (-) na sequência de linha germinal e deleções aparentes na região CDR3 são indicadas por um traço (-) na sequência clone.

Figura 1A: as sequências de aminoácidos de região variável de cadeia leve capa preditas de mAbs 3.1.1 e 7.1.2 com as sequências de aminoácidos de linha germinal do gene $V_k = A3/A19$ e $J = Jk1$.

Figura 1B: a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve capa predita do clone 15.1.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_k = A3/A19$ e $J = Jk2$);

Figura 1C: as sequências de aminoácidos de região variável de cadeia leve capa preditas de mAbs 10.8.3 e 21.4.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_k = L5 (DP5)$ e $J = Jk4$);

Figura 1D: a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada predita do mAb 3.1.1 e a

sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 3-30+$ (DP-49), $D = D4+DIR3$ e $J = J_H6$);

Figura 1E: a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada predita do mAb 7.1.2 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 3-30+$ (DP-49), $D = DIR5+D1-26$ e $J = J_H6$);

Figura 1F: as sequências de aminoácidos de cadeia pesada preditas do mAb 10.8.3 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 4,35$ (VIV-4), $D = DIR3$ e $J = J_H6$);

Figura 1G: as sequências de aminoácidos de região variável de cadeia pesada preditas do mAb 15.1.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 4-59$ (DP-71), $D = D4-23$ e $J = J_H4$); e

Figura 1H: as sequências de aminoácidos de região variável de cadeia pesada preditas do mAb 21.4.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 1-02$ (DP-75), $D = DLR1$ e $J = J_H4$).

A Figura 2A-2H são alinhamentos de sequência de sequências de aminoácidos preditas de domínios variáveis de cadeia leve e pesada de anticorpo monoclonal anti-CD40 isolados com as sequências de aminoácidos de linha germinal dos genes de cadeia leve e pesada correspondentes). Diferenças entre os clones e a sequência de linha germinal são indicadas em **negrito**. As sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 de linha germinal estão sublinhadas. Em alinhamentos de sequências de cadeia pesada, inserções aparentes à região CDR3 são indicadas por um traço (-) na sequência de linha germinal e deleções aparentes na região CDR3 são indicadas por um traço (-) na sequência clone.

A Figura 2A: as sequências de aminoácidos de cadeia leve capa preditas de mAbs 22.1.1, 23.5.1 e 23.29.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_K = A3/A19$ e $J = J_K1$);

A Figura 2B: a sequência de aminoácidos de cadeia leve capa predita do mAb 21.2.1 e a sequência de aminoácidos de

linha germinal ($V_k = A3/A19$ e $J = Jk3$);

A Figura 2C: as sequências de aminoácidos de cadeia leve capa preditas de mAbs 23.28.1, 23.28.1L-C92A e 24.2.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_k = A27$ e $J = Jk3$);

A Figura 2D: a sequência de aminoácidos de cadeia pesada predita do mAb 21.2.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 3-30+$, $D = DIR3+D6-19$ e $J = J_H4$);

A Figura 2E: a sequência de aminoácidos de cadeia pesada predita de mAbs 22.1.1, 22.1.1H-C109A e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 3-30+$, $D = D1-1$ e $J = J_H6$);

A Figura 2F: a sequência de aminoácidos de cadeia pesada predita do mAb 23.5.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 3-30+$, $D = D4-17$ e $J = J_H6$);

A Figura 2G: a sequência de aminoácidos de cadeia pesada predita do mAb 23.29.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 3-30,3$, $D = D4-17$ e $J = J_H6$); e

A Figura 2H: as sequências de aminoácidos de cadeia pesada preditas do mAb 23.28.1, 23.28.1H-D16E e 24.2.1 e a sequência de aminoácidos de linha germinal ($V_H = 4-59$, $D = D1R1+D4-17$ e $J = J_H5$).

A Figura 3 é uma curva de dose-resposta que ilustra a capacidade de um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) para aumentar a produção de IL-12p40 pelas células dendríticas humanas.

A Figura 4 é uma curva de dose-resposta que ilustra a capacidade de um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) para aumentar a produção de IL-12p70 pelas células dendríticas humanas.

A Figura 5 é um gráfico que ilustra a capacidade de um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) para aumentar a imunogenicidade de células estimuladoras Jy e aumentar a actividade de CTL contra células alvos Jy.

A Figura 6 é uma curva de inibição de crescimento

tumoral que ilustra o crescimento reduzido de tumores Daudi CD40 positivos em ratinhos bege SCID tratados com um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1).

A Figura 7 é uma curva de inibição de crescimento tumoral que ilustra o crescimento reduzido de tumores K562 CD40 negativos em ratinhos bege SCID tratados com um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) e células dendríticas humanas e células T.

A Figura 8 mostra a inibição no crescimento de tumores K562 CD40 negativos em ratinhos SCID por concentrações diferentes de mAb agonista anti-CD40 23.29.1.

A Figura 9 mostra a inibição no crescimento de tumores K562 CD40 negativos em ratinhos SCID por concentrações diferentes de mAb agonista anti-CD40 3.1.1.

A Figura 10 mostra a inibição no crescimento de tumores Raji CD40 positivos na presença e ausência de células T e células dendríticas em ratinhos SCID por um mAb agonista anti-CD40.

A Figura 11 mostra a inibição no crescimento de tumores Raji CD40 positivos em ratinhos SCID por anticorpos agonistas anti-CD40.

A Figura 12 mostra a inibição no crescimento ofBT 474 mama cancro células em ratinhos bege SCID por anticorpos agonistas anti-CD40.

A Figura 13 mostra a inibição no crescimento de tumores de próstata PC-3 em ratinhos bege SCID por anticorpos agonistas anti-CD40.

A Figura 14 é uma curva de sobrevivência para ratinhos bege SCID injectados (iv) com células tumorais Daudi e tratados com anticorpos agonistas anti-CD40.

A Figura 15 é uma análise de Western blot de anticorpos agonistas anti-CD40 para CD40 humano reduzido (R) e não reduzido (NR).

A Figura 16 é um alinhamento dos domínios D1-D4 de ratinho e CD40 humano.

A Figura 17 é um alinhamento das sequências de aminoácidos de CD40 de ratinho e humano mostrando a localização dos locais de fusão das quimeras.

A Figura 18 é um grupo de diagramas esquemáticos das construções de CD40 quiméricas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num dado aspecto, a presente invenção proporciona um anticorpo isolado ou porção de ligação a antígeno do mesmo que se liga a CD40 e tem as especificações como definido nas reivindicações.

A invenção proporciona uma composição que compreende o dito anticorpo anti-CD40, ou porção de ligação a antígeno do mesmo, e um veículo farmacologicamente aceitável. A composição pode compreender ainda outro componente, tal como um agente anti-tumoral ou um agente de formação de imagem. Métodos de diagnóstico e terapêuticos são também descritos no presente documento.

A invenção proporciona uma linha celular isolada, tal como um hibridoma, que produz o dito anticorpo anti-CD40 ou porção de ligação a antígeno do mesmo.

A invenção também proporciona moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada e/ou leve, ou porções de ligação a antígeno das mesmas, do dito anticorpo anti-CD40.

A invenção proporciona vectores e células hospedeiras que compreendem as ditas moléculas de ácido nucleico, bem como métodos de produção de maneira recombinante dos polipéptidos codificados pelas ditas moléculas de ácido nucleico.

Animais transgênicos não humanos que expressam a cadeia pesada e/ou leve, ou porções de ligação a antígeno das mesmas, do dito anticorpo anti-CD40 são também descritos no presente documento.

A invenção também proporciona a utilização do dito anticorpo ou fragmento do mesmo no tratamento de cancro ou

para aumentar a resposta imune. Também se descreve no presente documento um método para tratar um indivíduo em necessidade do mesmo com uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada e/ou leve, ou porções de ligação a antigénio da mesma, de um anticorpo anti-CD40. A invenção é especificada ainda nas reivindicações.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Definições e Técnicas Gerais

A não ser que de outro modo definido no presente documento, os termos científicos e técnicos utilizados em conexão com a presente invenção devem ter os significados que são comumente entendidos pelos peritos ordinários na especialidade. Além disso, a não ser que de outro modo requerido pelo contexto, os termos singulares devem incluir pluralidades e os termos no plural devem incluir os singulares. Geralmente, as nomenclaturas utilizadas em conexão com, e técnicas de, cultura celular e de tecidos, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e de proteínas e química de ácido nucleico e hibridação descrita no presente documento são aquelas bem conhecidas e comumente utilizadas na técnica.

Os métodos e técnicas da presente invenção geralmente são realizados de acordo com os métodos convencionais bem conhecidos na técnica e como descrito em diversas referências gerais e mais específicas que são citadas e debatidas em todo o presente memória descritiva, a não ser que de outro modo indicado. Veja-se, por exemplo, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. I. (1989) e Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), e Harlow e Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. I. (1990). As reacções enzimáticas e técnicas de purificação são

realizadas de acordo com as especificações do fabricante, como comumente executado na técnica ou como foi descrito no presente documento. A nomenclatura utilizada em conexão com, e os procedimentos e técnicas de laboratório, química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica descrita no presente documento são aqueles bem conhecidos e comumente usados na técnica. Técnicas padrão são usadas para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, e administração, e tratamento de pacientes.

Os seguintes termos, a não ser que de outro modo indicado, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados:

O termo "polipéptido" abrange as proteínas nativas ou artificiais, fragmentos de proteína e análogos de polipéptido de uma sequência de proteína. Um polipéptido pode ser monomérico ou polimérico.

O termo "proteína isolada", "polipéptido isolado" ou "anticorpo isolado" é uma proteína, polipéptido ou anticorpo que, em virtude da sua origem ou fonte de derivação (1), não é associado com as porções naturalmente associadas que o acompanham em seu estado nativo, (2) é livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Desta forma, um polipéptido que é quimicamente sintetizado ou sintetizado num sistema celular diferente da célula da qual naturalmente se origina será "isolado" de suas porções naturalmente associadas. Uma proteína também pode ser apresentada substancialmente isenta de porções naturalmente associados por isolamento, utilizando técnicas de purificação de proteína bem conhecidas na especialidade.

Exemplos de anticorpos isolados incluem um anticorpo anti-CD40 que foi purificado por afinidade usando CD40, um anticorpo anti-CD40 que foi sintetizado por um hibridoma ou outra linha celular *in vitro*, e um anticorpo anti-CD40

humano derivado a partir de um ratinho transgénico.

Uma proteína ou polipéptido é "substancialmente pura", "substancialmente homogénea", ou "substancialmente purificada" quando pelo menos cerca de 60 a 75 % de uma amostra apresenta uma única espécie de polipéptido. O polipéptido ou proteína pode ser monomérico ou multimérico. Um polipéptido ou proteína substancialmente pura compreenderá tipicamente cerca de 50 %, 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % p/p de uma amostra da proteína, mais geralmente cerca de 95 %, e de preferência será mais de 99 % pura. A pureza ou homogeneidade de proteína pode ser indicada por vários meios bem conhecidos na técnica, tais como a electroforese em gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguido pela visualização de um intervalo de polipéptido único após a coloração do gel com uma mancha bem conhecido na técnica. Para certos propósitos, resolução mais elevada pode ser fornecida por HPLC ou utilizando outros meios bem conhecidos na técnica de purificação.

O termo "fragmento de polipéptido", como é utilizado no presente documento refere-se a um polipéptido que possui uma anulação amino-terminal e/ou carboxi terminal, mas onde a sequência de aminoácido remanescente é idêntica às posições correspondentes na sequência de ocorrência natural. Em algumas formas de realização, os fragmentos são pelo menos 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de comprimento. Em outras formas de realização, os fragmentos são pelo menos 14, pelo menos 20, pelo menos 50, ou pelo menos, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento.

O termo "análogo de polipéptido" como é usado no presente documento refere-se a um polipéptido que compreende um segmento que tem identidade substancial a uma porção de uma sequência de aminoácidos e que tem pelo menos uma das seguintes propriedades: (1) ligação específica a CD40 sob condições de ligação adequadas, (2) capacidade para activar CD40, (3) a capacidade para regular

positivamente a expressão de moléculas de superfície celular tais como ICAM, MHC-II, B7-1, B7-2, CD71, CD23 e CD83, ou (4) a capacidade para aumentar a secreção de citocinas tais como IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23. Tipicamente, os análogos de polipéptido compreendem uma substituição de aminoácido conservativa (ou inserção ou deleção) com relação à sequência de ocorrência natural. Os análogos têm pelo menos 20 ou 25 aminoácidos de comprimento, ou preferivelmente pelo menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de comprimento ou mais longo, e podem muitas vezes ser tão longos quanto um polipéptido de ocorrência natural de comprimento total.

As substituições de aminoácido preferidas são aquelas que: (1) reduzem a susceptibilidade à proteólise, (2) reduzem a susceptibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade vinculativa para formar complexos de proteína, e (4) conferem ou modificam outras propriedades físico-químicas ou funcionais de tais análogos. Os análogos podem incluir várias substituições na sequência de péptido de ocorrência normal. Por exemplo, uma ou múltiplas substituições de aminoácido, de preferência substituições de aminoácido conservativas, podem ser preparadas na sequência de ocorrência normal (preferivelmente na parte do polipéptido fora do(s) domínio(s) que forma(m) os contactos intermoleculares). Uma substituição de aminoácido conservativa não deve alterar substancialmente as características estruturais da sequência de origem (por exemplo, um aminoácido de substituição não tenderia a quebrar a hélice que ocorre na sequência de origem, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a sequência de origem). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipéptidos reconhecidos na técnica são descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman e Company, Nova Iorque (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J.

Tooze, eds., Garland Publishing, Nova Iorque, N. I. (1991)); e Thornton *et al.*, Nature 354:105 (1991).

Os análogos de não-péptido são comumente utilizados na indústria farmacêutica como fármacos com propriedades análogas às daquelas do péptido padrão. Estes tipos de composto não péptido são denominados "miméticos de péptido" ou "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber e Freidinger, TINS p. 392 (1985); e Evans *et al.*, J. Med. Chem. 30:1229 (1987). Tais compostos são frequentemente desenvolvidos com o auxílio da modelagem molecular computadorizada. Os miméticos de péptido que são estruturalmente similares aos péptidos terapeuticamente úteis podem ser utilizados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. Geralmente, os peptidomiméticos são estruturalmente similares a um polipéptido paradigma (isto é, um polipéptido que possui uma propriedade bioquímica ou actividade farmacológica desejada), tais como anticorpos humanos, mas têm uma ou mais ligações peptídicas opcionalmente substituídas por uma ligação seleccionada a partir do grupo consistindo em: --CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH = CH-- (cis e trans), --COCH₂--, --CH(OH)CH₂--, e --CH₂SO--, por métodos bem conhecidos na especialidade. A substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma sequência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D- lisina no lugar de L-lisina) pode também ser usada para gerar péptidos mais estáveis. Além disso, péptidos forçados que compreendem uma sequência consenso ou uma variação de sequência consenso substancialmente idêntica podem ser gerados por métodos conhecidos na especialidade (Rizo e Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992); por exemplo, por meio da adição de resíduos internos de cisteína capazes de formar pontes dissulfeto intramoleculares que ciclizam o péptido.

Um "anticorpo" refere-se a um anticorpo completo ou a uma porção de ligação a antigénio do mesmo, que compete com

o anticorpo intacto para a ligação específica. Veja-se geralmente, *Fundamental Immunology*, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Porções de ligação a antígeno podem ser produzidas por técnicas de ADN recombinante ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Porções de ligação a antígeno incluem, *inter alia*, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, e fragmentos de região de determinação de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia simples (scFv), anticorpos quiméricos, diacorpos e polipéptidos que contêm pelo menos uma porção de um anticorpo que é suficiente para conferir ligação específica de antígeno ao polipéptido.

De N-terminal a C-terminal, ambos os domínios variáveis de cadeia leve e pesada compreendem as regiões FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos a cada domínio é de acordo com as definições de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 e 1991)), ou Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989).

Como é utilizado no presente documento, um anticorpo que é referido por número é um anticorpo monoclonal, que é obtido a partir do hibridoma do mesmo número. Por exemplo, anticorpo monoclonal 3.1.1 é obtido a partir do hibridoma 3.1.1.1.

Como é usado no presente documento, um fragmento Fd significa um fragmento de anticorpo que consiste nos domínios V_H e C_H 1; um fragmento Fv consiste nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989)) consiste num domínio V_H.

Em algumas formas de realização, o anticorpo é um anticorpo de cadeia simples (scFv) em que um V_L e domínios V_H são emparelhados para formar uma molécula monovalente (via um ligante sintético que possibilita que os mesmos

sejam como uma única cadeia de proteína. (Bird *et al.*, Science 242:423-426 (1988) e Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)). Em algumas formas de realização, os anticorpos são diacorpos, isto é, são anticorpos bivalentes em que os domínios V_H e V_L são expressos numa única cadeia de polipéptidos, mas usando um ligante que é curto demais que tem em conta o emparelhamento entre os dois domínios na mesma cadeia, deste modo forçando os domínios a emparelhar com domínios complementares de outra cadeia e criar dois locais de ligação a antigénio. (Veja-se, por exemplo, Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), e Poljak R J. *et al.*, Structure 2: 1121-1123 (1994)). Em algumas formas de realização, uma ou mais CDRs de um anticorpo da invenção podem ser incorporadas numa molécula covalentemente ou não covalentemente para torna-la uma imunoadesina que se liga especificamente a CD40. Em tais formas de realização, a(s) CDR(s) pode(m) ser incorporada(s) como parte de uma cadeia de polipéptidos maior, pode(m) ser covalentemente ligada(s) a outra cadeia de polipéptidos, ou pode(m) ser incorporada(s) não covalentemente.

Em formas de realização que tem um ou mais locais de ligação, os locais de ligação podem ser idênticos um ao outro ou podem ser diferentes.

Como é utilizado no presente documento, o termo "anticorpos humanos" significa qualquer anticorpo em que todas as sequências de domínio variáveis e constantes são sequências humanas. Estes anticorpos podem ser preparados de diversas maneiras, como será descrito a seguir.

O termo "anticorpo quimérico", como é utilizado no presente documento significa um anticorpo que compreende regiões de dois ou mais anticorpos diferentes. Numa forma de realização, uma ou mais das CDRs são derivadas a partir de um anticorpo anti-CD40 humano. Numa outra modalidade, as

CDRs de mais de um anticorpo anti-CD40 humano são combinadas num anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender uma CDR1 da cadeia leve de um primeiro anticorpo anti-CD40 humano, uma CDR2 da cadeia leve de um segundo anticorpo anti-CD40 humano e uma CDR3 da cadeia leve de um terceiro anticorpo anti-CD40 humano, e as CDRs da cadeia pesada podem ser derivadas de um ou mais outros anticorpos anti-CD40. Além disso, as regiões estruturais podem ser derivadas a partir de um dos mesmos anticorpos anti-CD40 ou de um ou mais anticorpos humanos diferentes.

Um "anticorpo de activação" (também denominado no presente documento como um "anticorpo agonista" como é usado no presente documento significa um anticorpo que aumenta uma ou mais actividades de CD40 em pelo menos cerca de 20 % quando adicionado a uma célula, tecido ou organismo que expressa CD40. Em algumas formas de realização, o anticorpo activa a actividade de CD40 em pelo menos 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %. Em algumas formas de realização, o anticorpo de activação é adicionado na presença de CD40L. Em algumas formas de realização, a actividade do anticorpo de activação é medida usando um ensaio de regulação positiva de molécula de superfície de sangue completo. Veja-se o Exemplo VII. Em outra forma de realização, a actividade do anticorpo de activação é medida usando um ensaio de célula dendrítica para medir a libertação de IL-12. Veja-se o Exemplo VIII. Em outra forma de realização a actividade do anticorpo de activação é medida usando um modelo de tumor *in vivo*. Veja-se o Exemplo X.

Os fragmentos ou análogos de anticorpos ou moléculas de imunoglobulina podem ser facilmente preparados pelos peritos ordinários na especialidade seguindo os ensinamentos deste memória descritiva. Os terminais amino e carboxi preferidos de fragmentos ou análogos ocorrem

próximos aos limites de domínios funcionais. Domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por meio da comparação dos dados de sequência de nucleótido e/ou aminoácidos com bases de dados de sequências públicas ou privadas. Preferentemente, métodos de comparação computadorizados são usados para identificar motivos de sequência ou domínios de conformação de proteína preditos que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecidas. Os métodos para identificar sequências de proteínas que se dobram numa estrutura tridimensional conhecida são conhecidos. Veja-se Bowie *et al*, Science 253:164 (1991).

O termo "ressonância de plasmão superficial", tal como é utilizado no presente documento, refere-se a um fenómeno óptico que leva em conta a análise das interacções bioespecíficas em tempo real mediante a detecção das alterações nas concentrações de proteína dentro de uma matriz biossensora, por exemplo, utilizando o sistema BIAcore™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, NJ). Para descrições adicionais, veja-se Jonsson U. *et al.*, Ann. Biol. Clin. 51: 19-26 (1993); Jonsson U. *et al.*, Biotechniques 11: 620-627 (1991); Jonsson B. *et al.*, J. Mol. Recognit. 8: 125-131 (1995); e Johnsson B. *et al.*, Anal. Biochem. 198: 268-277 (1991).

O termo " K_D " refere-se à constante da dissociação de equilíbrio de uma interacção anticorpo-antígeno particular.

O termo "epítopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz da ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor da célula T. Os determinantes epitópicos geralmente consistem de agrupamentos superficiais quimicamente activos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e possuem geralmente três características estruturais tridimensionais específicas, assim como características de carga específicas. Diz-se que um anticorpo se liga especificamente a um antigénio quando

a constante de dissociação de equilíbrio é $\leq \mu\text{M}$, preferentemente $\leq 100 \text{ nM}$ e mais preferentemente $\leq 10 \text{ nM}$.

Como é utilizado no presente documento, os vinte aminoácidos convencionais e respectivas abreviaturas seguem a utilização convencional. Veja-se *Immunology - A Synthesis* (2ª Edição, E.S. Golub e D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

O termo "polinucleótido" como denominado no presente documento significa uma forma polimérica de nucleótidos de pelo menos 10 bases de comprimento, ribonucleótidos ou desoxinucleótidos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleótido. O termo inclui as formas de filamento único ou duplo.

O termo "polinucleótido isolado" aqui usado significa um polinucleótido de origem genômico, ADNc ou sintética ou alguma combinação destes, que em virtude da sua origem o "polinucleótido isolado" (1) não é associado com todos ou uma parte dos polinucleótidos com que o "polinucleótido isolado" é encontrado na natureza, (2) é operativamente ligado a um polinucleótido que não é ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma sequência maior.

O termo "oligonucleótido" como é usado no presente documento inclui nucleótidos de ocorrência natural, e modificados ligados juntos por ligações de oligonucleótido de ocorrência natural e não de ocorrência natural. Os oligonucleótidos são um subconjunto de polinucleótidos geralmente que compreende um comprimento de 200 bases ou menos. Preferentemente, os oligonucleótidos são de 10 a 60 bases de comprimento e mais preferentemente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 a 40 bases de comprimento. Os oligonucleótidos são usualmente de cadeia simples, por exemplo, para iniciadores e sondas; embora os oligonucleótidos possam ser de cadeia dupla, por exemplo, para utilização na construção de um gene mutante. Os

oligonucleótidos da invenção podem ser oligonucleótidos senso ou antissenso.

O termo "nucleótidos de ocorrência natural" como é usado no presente documento inclui desoxirribonucleótidos e ribonucleótidos. O termo "nucleótidos modificados" como é usado no presente documento inclui nucleótidos com grupos de açúcar modificado ou substituído e similares. O termo "ligações de oligonucleótido" denominado no presente documento inclui ligações de oligonucleótidos tais como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, e similares. Veja-se, por exemplo, LaPlanche *et al.*, Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988); Zon *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon *et al.*, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Patente US Nº 5.151.510; Uhlmann e Peyman, Chemical Reviews 90: 543 (1990). Um oligonucleótido pode incluir uma etiqueta para detecção, se for desejado.

As sequências "operativamente ligadas" incluem tanto as sequências de controlo da expressão que são contíguas com o gene de interesse quanto as sequências de controlo da expressão que atuam *in trans* ou numa distância para controlar o gene de interesse. O termo "sequência de controlo da expressão", como é utilizado no presente documento significa as sequências de polinucleótido que são necessárias para efectuar a expressão e processamento das sequências de codificação a qual elas estão ligadas. As sequências de controlo da expressão incluem as sequências de início, término, promotoras e intensificadoras da transcrição apropriadas; sinais de processamento de ARN eficientes tais como os sinais de junção e poliadenilação; sequências que estabilizam o ARNm citoplasmático;

sequências que intensificam a eficiência de translação (ou seja, sequência de consenso Kozak); sequências que aumentam a estabilidade da proteína; e quando for desejado, sequências que intensificam a secreção de proteína. A natureza destas sequências de controlo difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais sequências de controlo geralmente incluem promotor, local de ligação ribossómico, e sequência de término da transcrição; em eucariotas, geralmente, tais sequências de controlo incluem promotores e sequência de término da transcrição. O termo "sequências de controlo" destina-se a incluir, no mínimo, todas as porções cuja presença é essencial para a expressão e processamento, e podem também incluir porções adicionais cuja presença é vantajosa, por exemplo, sequências líderes e sequências associadas de fusão.

O termo "vector", como é utilizado no presente documento, significa uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar um outro ácido nucleico a qual foi ligado. Em algumas formas de realização, o vector é um plasmídeo, ou seja, uma alça de filamento duplo do ADN em que os segmentos de ADN adicionais podem ser ligados. Em algumas formas de realização, o vector é um vector viral, em que os segmentos de ADN adicionais podem ser ligados no genoma viral. Em algumas formas de realização, os vectores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vectores bacterianos que tem uma origem bacteriana de replicação e vectores de mamífero epissómicos). Em outras formas de realização, os vectores (por exemplo, vectores de mamíferos não epissómicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após a introdução na célula hospedeira, e desse modo são replicados, juntamente com o genoma hospedeiro. Além disso, certos vectores são capazes de orientar a expressão dos genes para que eles sejam operativamente ligados. Tais vectores são referidos neste

documento como "vectores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vectores de expressão").

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como é utilizado no presente documento, significa uma célula em que um vector de expressão recombinante foi introduzido. É necessário compreender que "célula hospedeira recombinante" e "célula hospedeira" significam não apenas a célula objecto particular, mas também os descendentes de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer nas gerações que se sucedem devido à mutação ou influências ambientais, tais descendentes não podem, de fato, ser idênticos à célula de origem, mas são ainda incluídos dentro do âmbito do termo "célula hospedeira", como é utilizado no presente documento.

O termo "hibridam selectivamente" denominado no presente documento significa que se ligam de maneira detectável e especificamente. Polinucleótidos, oligonucleótidos e fragmentos dos mesmos de acordo com a invenção hibridam selectivamente com cadeias de ácido nucleico sob condições de hibridação e lavagem que minimizam quantidades apreciáveis de ligação detectável a ácidos nucleicos não específicos. Condições de "alta restringência" ou "altamente restritivas" podem ser usadas para conseguir condições de hibridação selectivas como conhecido na especialidade e discutido no presente documento. Um exemplo de condições de "alta restringência" ou "altamente restritivas" é a incubação de um polinucleótido com outro polinucleótido, em que um polinucleótido pode ser afixado a uma superfície sólida tal como uma membrana, num tampão de hibridação de 6X SSPE ou SSC, 50 % de formamida, 5X reagente de Denhardt, 0,5 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmão fragmentado e desnaturado numa temperatura de hibridação de 42 °C durante 12-16 horas, seguido por duas lavagens a 55 °C usando um

tampão de lavagem de 1X SSC, 0,5 % de SDS. Veja-se também Sambrook *et al.*, *supra*, pp. 9.50-9.55.

O termo "percentagem de identidade de sequência" no contexto de sequências de ácido nucleico significa que os resíduos em duas sequências são os mesmos quando alinhados para a correspondência máxima. O comprimento da comparação de identidade de sequência pode ser mais de uma extensão de pelo menos cerca de nove nucleótidos, geralmente, pelo menos cerca de 18 nucleótidos, mais geralmente pelo menos cerca de 24 nucleótidos, tipicamente pelo menos cerca de 28 nucleótidos, mais tipicamente pelo menos cerca de 32 nucleótidos, e preferivelmente pelo menos cerca de 36, 48 ou mais nucleótidos. Existem vários algoritmos diferentes conhecidos na técnica que podem ser usados para medir a identidade da sequência de nucleótido. Por exemplo, as sequências de polinucleótido podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit, que são programas em Wisconsin Package Versão 10.0; Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que inclui, por exemplo, os programas FASTA2 e FASTA3, proporciona alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol.* 276, 71-84 (1998). A não ser que de outro modo especificado, os parâmetros padrão de um programa ou algoritmo particular são utilizados. Por exemplo, a identidade de sequência percentual entre as sequências de ácidos nucleico pode ser determinada utilizando FASTA com os seus parâmetros padrão (um tamanho de palavra 6 e o factor NOPAM para a matriz de pontuação) ou usando Gap com os seus parâmetros padrão como previsto na GCG Versão 6.1.

Uma referência a uma sequência de nucleótidos abrange o seu complemento a não ser que de outro modo especificado.

Assim, uma referência a um ácido nucleico que tem uma sequência particular deve ser entendida de abranger seu filamento complementar, com a sua sequência complementar.

Na especialidade de biologia molecular, os investigadores utilizam os termos "percentagem de identidade de sequência", "percentagem de similaridade de sequências" e "percentagem de homologia de sequências" intercambiavelmente. Neste pedido, estes termos terão o mesmo significado com respeito a sequências de ácido nucleico somente.

O termo "similaridade substancial" ou "similaridade de sequência substancial", quando refere-se a um ácido nucleico ou seu fragmento, significa que quando idealmente alinhado com as inserções ou deleções de nucleótido apropriadas com outro ácido nucleico (ou a seu filamento complementar), existe identidade sequência de nucleótidos em pelo menos cerca de 85 %, de preferência pelo menos cerca de 90 % e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % das bases de nucleótido, como medido por qualquer algoritmo bem conhecido da identidade de sequência, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como debatido acima.

Como aplicado aos polipéptidos, o termo "identidade substancial" significa que duas sequências de péptidos, quando idealmente alinhadas, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT utilizando pesos de abertura padrão, compartilham pelo menos 70 %, 75 % ou 80 % de identidade de sequência, preferivelmente pelo menos 90 % ou 95 % de identidade de sequência, e mais preferivelmente pelo menos 97 %, 98 % ou 99 % de identidade de sequência. Preferivelmente, as posições residuais que não são idênticas diferem pelas substituições de aminoácido conservativas. Uma "substituição conservativa de aminoácidos" é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido que tem um

grupo R de cadeia lateral com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservativa não irá alterar substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos diferem uma da outra por substituições conservativas, a identidade de sequência percentual ou grau de semelhança pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservativa da substituição. Meios para fazer esse ajuste são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Pearson, *Methods Mol. Biol.* 243:307-31 (1994). Exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas similares incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadeias laterais de hidroxilo alifático: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina, e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: ácido aspártico e ácido glutâmico; e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservativos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, e asparagina-glutamina.

Alternativamente, uma substituição conservativa é qualquer mudança que tem um valor positivo na matriz de probabilidade log PAM250 divulgada em Gonnet *et al.*, *Science* 256: 1443-45 (1992). A substituição "moderadamente conservativa" é qualquer mudança que tem um valor não negativo na matriz de probabilidade log PAM250.

A similaridade de sequência para os polipéptidos, que também é referida como a identidade de sequência, é tipicamente medida utilizando software de análise de sequência. O software de análise de proteína compara as

sequências similares utilizando medidas de similaridade atribuída às várias substituições, supressões e outras modificações, incluindo as substituições de aminoácido conservativas. Por exemplo, GCG contém programas como "Gap" e "Bestfit" que podem ser usados com parâmetros de valor padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre os polipéptidos estritamente relacionados, tais como polipéptidos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína tipo silvestre e uma muteína desta. Veja-se, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipéptidos também podem ser comparadas usando FASTA utilizando parâmetros padrão ou recomendados, um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) proporciona alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e pesquisa (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132: 185-219 (2000)). Outro algoritmo preferido quando se compara uma sequência da invenção com um banco de dados contendo um grande número de sequências de diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente *blastp* ou *tblastn*, usando parâmetros padrão. Veja-se, por exemplo, Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402 (1997).

O comprimento de sequências de polipéptidos em comparação com a homologia será geralmente de pelo menos cerca de 16 resíduos de aminoácido, usualmente pelo menos cerca de 20 resíduos, mais usualmente pelo menos cerca de 24 resíduos, tipicamente pelo menos cerca de 28 resíduos, e preferentemente mais de cerca de 35 resíduos. Ao pesquisar uma base de dados contendo sequências de um grande número de diferentes organismos, é preferível comparar as sequências de aminoácido.

Como é utilizado no presente documento, o termo

"etiqueta" ou "etiquetado" refere-se à incorporação de uma outra molécula no anticorpo. Numa forma de realização, a etiqueta é um marcador detectável, por exemplo, a incorporação de um aminoácido radioretiquetado ou ligação a um polipéptido de porções de biotinilo que pode ser detectado pela avidina etiquetada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou actividade enzimática que pode ser detectada pelos métodos ópticos ou colorimétricos). Em outra forma de realização, o etiqueta ou marcador pode ser terapêutico, por exemplo, um conjugado de medicamento ou toxina. Vários métodos de etiquetagem de polipéptidos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de etiquetas para polipéptidos incluem, mas não são limitados a, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), etiquetas fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos lantanídeos), etiquetas enzimáticas (por exemplo, peroxidase rábano silvestre, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimioluminescentes, grupos de biotinilo, epítomos de polipéptidos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zipper de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epítopo), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas tais como a toxina da pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, Diidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glicocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos destes. Em algumas formas de realização, as etiquetas são ligadas por subdivisões de espaçador de vários comprimentos para

reduzir impedimento estérico potencial.

O termo paciente inclui indivíduos humanos e veterinários.

Ao longo desta memória descritiva e reivindicações, a palavra "compreendem," ou variações tais como "compreende" ou "que compreende," serão entendidos que implicam a inclusão de um número inteiro indicado ou grupo de números inteiros, mas não a exclusão de qualquer outro número inteiro ou grupo de números inteiros.

Anticorpos Anti-CD40 Humanos e Caracterização Dos Mesmos

Os anticorpos humanos evitam certos problemas associados a anticorpos que possuem regiões variável e/ou constante não humanas (por exemplo, roedor). Tais problemas incluem a rápida depuração dos anticorpos ou resposta imune contra o anticorpo. Portanto, numa forma de realização, a invenção proporciona anticorpos anti-CD40 humanizados como caracterizado nas reivindicações. Em outra forma de realização, a invenção proporciona anticorpos anti-CD40 humanos como caracterizado nas reivindicações. Em algumas formas de realização, anticorpos anti-CD40 humanos são produzidos por meio da imunização de um roedor cujo genoma compreende genes de imunoglobulina humana de modo que o roedor produz anticorpos humanos. Espera-se que os anticorpos anti-CD40 humanos minimizem as respostas imunogénicas e alérgicas intrínsecas a anticorpos monoclonais (Mabs) não humanos ou derivatizados não humanos e assim para aumentar a eficácia e segurança dos anticorpos administrados. Pode ser esperado que a utilização de anticorpos completamente humanos proporcione uma vantagem substancial no tratamento de doenças humanas crónicas e recorrentes, tais como inflamação e cancro, o que pode requerer administrações repetidas de anticorpos.

A invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano de activação (mAb) e a linha de células de hibridoma que o produz. Dez anticorpos monoclonais anti-

CD40 humanos de activação adicionais e as linhas de células de hibridoma que os produzem são também descritos. O Quadro A lista os identificadores de sequência (SEQ ID NOS:) dos ácidos nucleicos que codificam as cadeias leve e pesada de comprimento completo (incluindo sequência líder), o correspondente sequências de aminoácidos deduzidas de comprimento completo, e a sequência de aminoácidos deduzida e de nucleótidos das regiões variáveis de cadeia leve e pesada.

Quadro A

ANTICORPOS ANTI-CD40 HUMANOS								
MAb	IDENTIFICADOR DE SEQUÊNCIA (SEQ ID NO:)							
	Região Variável				Comprimento Completo			
	Pesada		Leve		Pesada		Leve	
	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína	ADN	Proteína
3.1.1	1	2	3	4	5	6	7	8
7.1.2	9	10	11	12	13	14	15	16
10.8.3	17	18	19	20	21	22	23	24
15.1.1	25	26	27	28	29	30	31	32
21.2.1	33	34	35	36	37	38	39	40
21.4.1	41	42	43	44	45	46	47	48
22.1.1	49	50	51	52	53	54	55	56
23.5.1	57	58	59	60	61	62	63	64
23.28.1	65	66	67	68	69	70	71	72
23.29.1	73	74	75	76	77	78	79	80
24.2.1	81	82	83	84	85	86	87	88

Descrito ainda no presente documento está o mAb anti-CD40 humano 23.23.1 e a linha de células de hibridoma que o produz.

Se descrevem no presente documento ainda variantes de cadeia pesada e/ou leve de certos dos mAbs anti-CD40 humanos listados acima, que compreendem uma ou mais substituições de aminoácido. A invenção proporciona duas

cadeias pesadas variantes de mAb 3.1.1. Numa, a alanina no resíduo 78 é alterada a treonina. Na segunda, a alanina no resíduo 78 é alterada a treonina, e as valinas nos resíduos 88 e 97 são alteradas a alaninas. A invenção também proporciona uma cadeia leve variante de mAb 3.1.1 em que a leucina no resíduo 4 e a leucina no resíduo 83 são alteradas a metionina e valina, respectivamente. A combinação com uma cadeia pesada ou leve variante com uma cadeia pesada ou leve do tipo selvagem, respectivamente é designada pela cadeia mutante. Assim, um anticorpo contendo uma cadeia leve do tipo selvagem e uma cadeia pesada que compreende a mutação de alanina a treonina no resíduo 78 é designada como 3.1.1H-A78T. No entanto, em outras formas de realização da invenção, os anticorpos contendo qualquer combinação de uma cadeia pesada variante e a cadeia leve variante de 3.1.1 são incluídos.

Também se descreve no presente documento uma variante da cadeia pesada de mAb 22.1.1 em que a cisteína no resíduo 109 é alterada a uma alanina. Um anticorpo monoclonal que compreende a cadeia pesada variante e a cadeia leve 22.1.1 é designada mAb 22.1.1 H-C109A. Descritas ainda no presente documento estão duas cadeias pesadas variantes e uma cadeia leve variante de mAb 2328.1. Numa cadeia pesada variante, o ácido aspártico no resíduo 16 é alterado a ácido glutâmico. Um mAb que compreende a cadeia pesada variante e a cadeia leve 23.28.1 é designada 23-28.1 H-D16E. A memória descritiva também revela uma cadeia leve variante 23.28.1 em que a cisteína no resíduo 92 é alterada a uma alanina. Um mAb que compreende a cadeia pesada 2328.1 e a cadeia leve variante é designada 23.28.1 L C92A. Também se descrevem no presente documento mAbs que compreendem qualquer das variantes de cadeia pesada 23.28.1 com a variante de cadeia leve 23.28.1.

A cadeia leve produzida pelo hibridoma 23.29.1 contém uma mutação na região constante no resíduo 174. A cadeia

leve produzida pelo hibridoma tem arginina nesta posição ao invés da lisina canónica. Consequentemente, esta memória descritiva também descreve uma cadeia leve 23.29.1 com a lisina canónica no resíduo 174 e um mAb, designado 2329.1L-R174K, que compreende a cadeia pesada 2329.1 e a cadeia leve variante.

Os anticorpos anti-CD40 3.1.1, 3.1.1HA78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C29A, 23.29.1, 23.29.1L-R17 K, e 24.2.1 são descritos no presente documento. Numa forma de realização preferida o anticorpo anti-CD40 é 21.4.1. Em alguns exemplos o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir da SEQ ID NO: 8, 16, 34, 32, 40, 56, 64, 72, 80, 88, 94, 100 ou 102 ou a região variável da mesma, ou codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada a partir da SEQ ID NO: 7, 15, 23, 31, 39, 55, 63, 71, 79, 87, 93, 99 ou 101. Numa forma de realização, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48 ou a região variável da mesma, ou codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 47. Em alguns exemplos descritos no presente documento, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia leve que compreende pelo menos a CDR2 de um dos anticorpos listados, uma das sequências de aminoácidos identificadas acima (como mostrado nas Figs. 1A-1C e 2A-2C) ou codificada por uma das sequências de ácido nucleico identificadas acima. Em outro exemplo descrito no presente documento, a cadeia leve compreende ainda uma CDR1 e uma CDR3 independentemente seleccionadas a partir de uma região variável de cadeia leve que compreende não mais de dez aminoácidos da sequência de aminoácidos codificada por um gene de linha germinal V κ A3/A19, L5 ou A27, ou compreende uma CDR1 e uma CDR3 independentemente

seleccionadas a partir de uma CDR1 e CDR3 de (1) um anticorpo seleccionado a partir de 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 2328.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K ou 24.2.1; (2) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 ou 102 ou (3) codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93, 99 ou 101.

Em outro exemplo descrito no presente documento, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 6, 14, 22, 30, 38, 54, 62, 70, 78 ou 86 ou a região variável da mesma ou codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 5, 13, 21, 29, 37, 53, 61, 69, 77 ou 85. Numa forma de realização, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46 ou a região variável da mesma, ou codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 45. Em alguns exemplos descritos no presente documento, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada que compreende pelo menos a CDR3 de um dos anticorpos listados, uma das sequências de aminoácidos identificadas acima (como mostrado nas Figs. 1A-1C e 2A-2C) ou codificada por uma das sequências de ácido nucleico identificadas acima. Em outro exemplo descrito no presente documento, a cadeia pesada compreende ainda uma CDR1 e uma CDR2 independentemente seleccionadas a partir de uma região variável de cadeia pesada que compreende não mais de dezoito aminoácidos da sequência de aminoácidos codificada por um gene de linha germinal V_H 3-30+, 4-59, 1-02, 4.35 ou 3-30,3, ou compreende uma CDR1 e uma CDR2 independentemente seleccionadas a partir de uma CDR1 e CDR2 de (1) um anticorpo seleccionado a partir de 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1,

23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 e 24.2.1; (2) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 ou 98 ou (3) codificada pela sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 ou 97. Em outra forma de realização, o anticorpo anti-CD40 compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve do anticorpo 21.4.1 como definido acima.

Como é usado no presente documento, o anticorpo 3.1.1H-A78T é idêntico a esse de 3.1.1 excepto que o resíduo 78 da cadeia pesada é treonina ao invés de alanina. De maneira similar, no anticorpo 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, o resíduo 78 é alterado a um, e resíduos 88 e 97 são alterados de valina a alanina na cadeia pesada. O anticorpo 3.1.1L-L4M-L83V é idêntico a esse de 3.1.1 excepto que o resíduo 4 é metionina ao invés de leucina e o resíduo 83 é valina ao invés de leucina na cadeia leve. O anticorpo 22.1.1H-C109A é idêntico a esse de 22.1.1 excepto que o resíduo 109 da cadeia pesada é alterado de uma cisteína a uma alanina. Os anticorpos 23.28.1H-D16E e 23.28.1L-C92A são idênticos a esse de 23.28.1 excepto que o resíduo 16 da cadeia pesada é alterado de aspartato a glutamato, e o resíduo 92 da cadeia leve é alterado de cisteína a alanina, respectivamente. O anticorpo 23.29.1L-R174K é idêntico a esse de 23.29.1 excepto que o resíduo 174 da cadeia leve é alterado de arginina a lisina.

Classe e Subclasse de Anticorpos Anti-CD40

A classe e subclasse de anticorpos anti-CD40 podem ser determinadas por qualquer método conhecido na técnica. Em geral, a classe e a subclasse de um anticorpo podem ser determinadas utilizando anticorpos que são específicos de uma classe e subclasse particulares de anticorpos. Esses anticorpos estão disponíveis comercialmente. A classe e a subclasse podem ser determinadas por ELISA, ou Western Blot, assim como outras técnicas. Alternativamente, a

classe e a subclasse podem ser determinadas pelo sequenciamento total ou uma parte dos domínios constante das cadeias pesadas e/ou leves dos anticorpos, comparando suas sequências de aminoácidos com as sequências de aminoácidos conhecidas de várias classes e subclasses de imunoglobulinas, e determinando a classe e subclasse dos anticorpos.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é um anticorpo monoclonal. O anticorpo anti-CD40 pode ser uma molécula de IgG, uma molécula de IgM, uma molécula de IgE, uma molécula de IgA ou uma molécula de IgD. Numa forma de realização preferida, o anticorpo anti-CD40 é uma IgG e é uma subclasse IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em outra forma de realização preferida, os anticorpos anti-CD40 são a subclasse IgG2.

Selectividade de Molécula e Espécie

Num outro aspecto da invenção, os anticorpos anti-CD40 demonstram selectividade tanto da espécie quanto da molécula. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 liga-se a CD40 de primata e humano. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 liga-se a CD40 humano, de cinomolgos ou rhesus. Em outras formas de realização, o anticorpo anti-CD40 não se liga a CD40 de ratinho, rato, cão ou coelho. Seguindo os ensinamentos da memória descritiva, pode-se determinar a selectividade da espécie para o anticorpo anti-CD40 usando métodos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, pode-se determinar selectividade de espécies usando Western blot, FACS, ELISA ou RIA. (Veja-se, por exemplo, Exemplo IV).

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 tem uma selectividade para CD40 que é mais de 100 vezes maior que a sua selectividade para RANK (activador de receptor de capa B de factor nuclear), 4-1BB (CD137), TNFR-1 (Receptor-1 Factor de Necrose Tumoral) e TNFR-2 (Receptor-2 de factor de necrose tumoral). Em algumas

formas de realização, o anticorpo anti-CD40 não exhibe qualquer ligação específica apreciável a qualquer outra proteína diferente de CD40. Pode-se determinar a selectividade do anticorpo anti-CD40 para CD40 usando métodos bem conhecidos na especialidade seguindo os ensinamentos da memória descritiva. Por exemplo, pode-se determinar a selectividade usando Western blot, FACS, ELISA ou RIA. (Veja-se, por exemplo, Exemplo V).

Identificação de CD40 Epítomos Reconhecido por anticorpo anti-CD40

Além disso, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano que se liga a CD40 e compete de maneira cruzada com e/ou liga-se ao mesmo epítopo e/ou liga-se a CD40 com a mesma K_D que o anticorpo anti-CD40 humano 21.4.1. Os anticorpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 2328.1H-D16E, 2328.1L-C92A, 2329.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1 também são revelados no presente documento sob este aspecto. A invenção também proporciona um anticorpo anti-CD40 humano que compreende uma região variável de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 Também descrito no presente documento sob este aspecto são SEQ ID NOs: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 ou 98. A invenção também proporciona um anticorpo anti-CD40 humano que compreende uma região variável de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44. As SEQ ID NOs: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100 ou 102 também são descritas no presente documento sob este aspecto.

Pode-se determinar se um anticorpo liga-se ao mesmo epítopo ou compete de maneira cruzada para a ligação com um anticorpo anti-CD40 usando métodos conhecidos na técnica. Numa forma de realização, pode-se permitir que o anticorpo anti-CD40 da invenção se ligue a CD40 sob condições de

saturação e então medir a capacidade do anticorpo de teste de ligar-se a CD40. Se o anticorpo de teste for capaz de ligar-se ao CD40 ao mesmo tempo que o anticorpo anti-CD40, então o anticorpo de teste liga-se a um epítopo diferente que o anticorpo anti-CD40. No entanto, se o anticorpo de teste não for capaz de ligar-se ao CD40 ao mesmo tempo, então o anticorpo de teste liga-se ao mesmo epítopo, um epítopo sobreposto, ou um epítopo que está em proximidade imediata ao epítopo ligado pelo anticorpo humano e CD40. Esta experiência pode ser realizada usando ELISA, RIA, FACS ou ressonância de plasmão de superfície. (Veja-se, por exemplo, Exemplo VL) Numa forma de realização preferida, a experiência é realizada usando ressonância de plasmão de superfície. Numa forma de realização mais preferida, BIAcore é usado.

Afinidade de Ligação dos Anticorpos Anti-CD40 a CD40

Em algumas formas de realização da invenção, o anticorpo anti-CD40 liga-se a CD40 com alta afinidade. Como descrito no presente documento, o anticorpo anti-CD40 liga-se a CD40 com uma K_D de 2×10^{-8} M ou menos. Também descrito no presente documento é que o anticorpo se liga a CD40 com uma K_D de 2×10^{-9} , 2×10^{-10} , $4,0 \times 10^{-11}$ M ou menos. Numa forma de realização preferida, o anticorpo liga-se a CD40 com uma K_D de 4×10^{-10} M ou menos. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_D que o anticorpo 21.4.1. Também descrito no presente documento sob este aspecto são os anticorpos 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10,83, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23-28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K ou 24.2.1. Em outra forma de realização preferida, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_D que um anticorpo que compreende uma CDR2 de uma cadeia leve, e/ou uma CDR3 de uma cadeia pesada do anticorpo 21.41. Também descrito no presente documento sob

este aspecto são os anticorpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A.V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7,12, 10,83, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.18.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1. Em ainda outra forma de realização preferida, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_D que um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou que compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

Também descrito no presente documento sob este aspecto são anticorpos que compreendem uma região variável de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96, ou 98 ou que compreendem uma região variável de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, ou 102. Em outra forma de realização preferida, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_D que um anticorpo que compreende uma CDR2 de uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44 ou uma CDR3 de uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42

Também descrito no presente documento sob este aspecto são anticorpos que compreendem uma CDR2 de uma região variável de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, ou 102 ou uma CDR3 de uma região variável de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ NO: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96, ou 98.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 tem uma taxa de dissociação baixa. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 tem uma K_{off} de $2,0 \times 10^{-4}$

ou inferior. Em algumas formas de realização, a K_{off} é $2,0 \times 10^{-7}$ ou inferior. Em algumas formas de realização, a K_{off} é substancialmente a mesma que um anticorpo reivindicado no presente documento. Também descrito no presente documento sob este aspecto são os anticorpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_{off} que um anticorpo que compreende uma CDR3 de uma cadeia pesada ou uma CDR2 de uma cadeia leve do anticorpo 21.4.1. Também descrito no presente documento sob este aspecto são anticorpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L44-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 12.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1. Em algumas formas de realização, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_{off} que um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:42 ou que compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44.

Os anticorpos que compreendem uma região variável de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96, ou 98 ou que compreendem uma região variável de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, ou 102 também são descritos no presente documento sob este aspecto. Em outra forma de realização preferida, o anticorpo liga-se a CD40 com substancialmente a mesma K_{off} que um anticorpo que compreende uma CDR2 de uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44 ou uma CDR3 de uma cadeia pesada que tem a sequência de

aminoácidos da SEQ ID NO: 46.

Os anticorpos que compreendem uma CDR2 de uma região variável de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4, 12, 20, 28, 36, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, ou 102 ou uma CDR3 de uma cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 6, 14, 22, 30, 38, 54, 62, 70, 78, 86, 90, 92, 96, ou 98 também são descritos no presente documento sob este aspecto.

A afinidade de ligação e taxa de dissociação ou um anticorpo anti-CD40 a CD40 podem ser determinadas por qualquer método conhecido na especialidade. A afinidade de ligação pode ser medida por ELISAs competitivos, RIAs, ou ressonância de plasmão superficial, tal como BIAcore™. A taxa de dissociação pode ser medida também pela ressonância de plasmão superficial. Preferivelmente, a afinidade de ligação e taxa de dissociação é medida pela ressonância de plasmão superficial. Mais preferivelmente, a afinidade de ligação e taxa de dissociação são medidas utilizando um BIAcore™. Veja-se, por exemplo, Exemplo XIV.

Utilização de Gene de Cadeia Leve e Pesada

Um anticorpo anti-CD40 da invenção pode compreender uma cadeia capa humana ou lambda humana ou uma sequência de aminoácido derivada da mesma. Em algumas formas de realização que compreende uma cadeia leve capa, o domínio variável de cadeia leve (V_L) é codificado em parte por um gene humano A3/A19 (DPK-15), L5 (DP5), ou A27 (DPK-22) V_K .

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a V_L do anticorpo anti-CD40 contém uma ou mais substituições de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos de linha germinal. Em alguns destes exemplos, a V_L do anticorpo anti-CD40 compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 substituições de aminoácidos em relação à sequência de aminoácidos de linha germinal. Em alguns exemplos, uma ou mais das substituições da linha germinal estão nas regiões CDR da cadeia leve. Em algumas formas de

realização, as substituições de aminoácidos em relação à linha germinal estão nas mesmas posições que as substituições em relação à linha germinal na V_L do anticorpo 21.4.1. Também descrito no presente documento sob este aspecto são anticorpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.83, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1. Por exemplo, a V_L do anticorpo anti-CD40 pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos em comparação com a linha germinal encontrada no anticorpo 21.4.1, e outras substituições de aminoácidos em comparação com a linha germinal encontrada no anticorpo 10.8.3 que utiliza o mesmo gene V_K que o anticorpo 21.4.1. Em alguns exemplos descritos no presente documento, as mudanças de aminoácidos estão numa ou mais das mesmas posições, mas envolvem uma mutação diferente do que no anticorpo de referência.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, as mudanças de aminoácidos em relação à linha germinal ocorrem numa ou mais das mesmas posições que em qualquer da V_L de anticorpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1, mas as mudanças podem representar substituições conservativas de aminoácidos em tal(is) posição(ões) em relação ao aminoácido no anticorpo de referência. Por exemplo, se uma posição particular num destes anticorpos for alterada em relação à linha germinal e for glutamato, pode-se substituir aspartato conservativamente nessa posição. De maneira similar, se um aminoácido substituição em comparação com linha germinal for serina, pode-se substituir conservativamente treonina por serina nessa posição. As substituições conservativas de aminoácidos são discutidas *supra*.

Em algumas formas de realização, a cadeia leve do anticorpo anti-CD40 humano compreende a sequência de

aminoácidos que é a mesma que a sequência de aminoácidos da V_L de anticorpo 21.4.1 (SEQ ID NO:44). Também são descritas no presente documento sob este aspecto as sequências de aminoácidos da V_L de anticorpo 3.1.1 (SEQ. ID NO: 4), 3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO: 94), 7.1.2 (SEQ. ID NO: 12), 10.8.3 (SEQ. ID NO: 20), 15.1.1 (SEQ. ID NO: 28), 21.2.1 (SEQ.ID NO: 36), 22.1.1 (SEQ. ID NO: 52), 23.5.1 (SEQ. ID NO: 60), 23.28.1 (SEQ. ID NO: 68), 23.28.1L-C92A (SEQ. ID NO: 100), 23.29.1 (SBQ. ID NO:76), 23.29.1L-R174K (SBQ ID NO: 102) ou 24.2.1 (SEQ. ID NO:84). Também descritas no presente documento estão as ditas sequências de aminoácidos que têm até 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 10 substituições conservativas de aminoácidos e/ou um total de até 3 substituições não conservativas de aminoácidos.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a cadeia leve do anticorpo anti-CD40 compreende pelo menos a cadeia leve CDR2, e pode também compreender as regiões CDR1 e CDR3 de uma sequência de linha germinal, como descrito no presente documento. Em outro exemplo descrito no presente documento, a cadeia leve pode compreender uma CDR1 e CDR2 de um anticorpo independentemente seleccionado a partir de 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1. 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1. 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 e 24.2.1, ou regiões CDR cada uma tendo menos de 8, menos de 6, menos de 4 ou menos de 3 substituições conservativas de aminoácidos e/ou um total de três ou menos substituições não conservativas de aminoácidos. Em outros exemplos descritos no presente documento, a cadeia leve do anticorpo anti-CD40 compreende pelo menos a cadeia leve CDR2, e pode também compreender as regiões CDR1 e CDR3, cada uma das quais é independentemente seleccionada a partir das regiões CDR1 e CDR3 de um anticorpo que tem uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 ou 100, ou

codificada por uma molécula de ácido nucleico seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 ou 99.

Com relação à cadeia pesada, em alguns exemplos descritos, a região variável da sequência de aminoácidos de cadeia pesada é codificada em parte por um gene V_H 3-30+, V_H 4-59- V_H 1-02, V_H 4.35 ou V_H 3-30.3 humano. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a V_H do anticorpo anti-CD40 contém uma ou mais substituições de aminoácidos, deleções ou inserções (adições) em relação à sequência de aminoácidos de linha germinal. Em alguns exemplos descritos no presente documento, o domínio variável da cadeia pesada compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 mutações da sequência de aminoácidos de linha germinal. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a(s) mutação(ões) é/são substituições não conservativas em comparação com a sequência de aminoácidos da linha germinal. Em alguns exemplos descritos no presente documento, as mutações estão nas regiões de CDR da cadeia pesada. Em algumas formas de realização, as mudanças de aminoácidos são feitas nas mesmas posições que as mutações da linha germinal na V_H de anticorpo 21.4.1. Também são descritas aqui as mudanças de aminoácidos feitas sob este aspecto em qualquer uma ou mais das V_H de anticorpos 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-Y88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3. 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 e 2421. Em outros exemplos descritos no presente documento, as mudanças de aminoácidos estão numa ou mais das mesmas posições, mas envolvem uma mutação diferente do que no anticorpo de referência.

Em algumas formas de realização, a cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos do domínio variável (VH) do anticorpo 21.4.1 (SEQ ID NO:42). Também descrito no presente documento sob este aspecto são anticorpos 3.1.1 (SEQ ID NO:2), 3.1.1H-A78T (SEQ ID NO: 90), 3.1.1H-A78T-

V88A-V97A (SEQ ID NO: 92), 7.1.2 (SEQ ID NO: 10). 10.8.3 (SEQ ID NO: 18), 15.1.1 (SEQ ID NO: 26), 21.2.1 (SEQ ID NO: 34), 22.1.1 (SEQ ID NO: 50), 22.1.1H-C109A (SEQ m NO: 96), 23.5.1 (SEQ ID NO: 58), 23.28.1 (SEQ ID NO: 66), 23.28.1H-D16E (SEQ ID No:98), 23.29.1 (SEQ ID NO: 74) e 24.2.1 (SEQ ID NO:82). Também são descritas no presente documento sob este aspecto as ditas sequências de aminoácidos que têm até 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 10 substituições conservativas de aminoácidos e/ou um total de até 3 substituições não conservativas de aminoácidos.

Em algumas formas de realização, a cadeia pesada compreende a cadeia pesada CDR1. CDR2 e CDR3 regiões de anticorpo 21.4.1. Também descrito no presente documento sob este aspecto são anticorpo 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 e 24.2.1 (como mostrado nas Figs. 1D-1H ou 2D-2H). Em alguns exemplos descritos no presente documento as ditas regiões CDR têm, cada uma, menos de 8, menos de 6, menos de 4, ou menos de 3 substituições conservativas de aminoácidos e/ou um total de três ou menos substituições não conservativas de aminoácidos.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a cadeia pesada compreende uma CDR3, e pode também compreender as regiões CDR1 e CDR2 de uma sequência de linha germinal, como descrito acima, ou pode compreender uma CDR1 e CDR2 de um anticorpo, cada uma das quais é independentemente seleccionada a partir de um anticorpo que compreende cadeia pesada de um anticorpo seleccionado a partir de 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 e 24.2.1. Em outro exemplo descrito no presente documento, a cadeia pesada compreende uma CDR3, e pode também compreender as regiões CDR1 e CDR2, cada uma das quais é independentemente

seleccionada a partir de uma CDR1 e CDR2 região de uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26,34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 ou 98 (como mostrado nas Figs. 1D-1H ou Figs. 2D-2H) ou codificada por uma sequência de ácido nucleico seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 ou 97. Em outra forma de realização o anticorpo compreende uma cadeia pesada de anticorpo 21.4.1 como revelado acima e uma cadeia leve de anticorpo 21.4.1 como revelado acima.

Um tipo de substituição de aminoácido que pode ser produzido é alterar uma ou mais cisteínas no anticorpo, que pode ser quimicamente reactiva, com um outro resíduo, tal como, sem limitação, alanina ou serina. Num exemplo descrito no presente documento, a substituição de cisteína é feita numa região estrutural de um domínio variável ou no domínio constante de um anticorpo. Em outro exemplo, a cisteína é uma região não canónica do anticorpo. Outro tipo de substituição de aminoácidos que pode ser feito é mudar quaisquer locais proteolíticos potenciais no anticorpo, particularmente aqueles que estão numa região estrutural de um domínio variável, no domínio constante de um anticorpo, ou numa região não canónica do anticorpo. A substituição de resíduos de cisteína e remoção de locais proteolíticos podem diminuir o risco de qualquer heterogeneidade no produto de anticorpo e assim aumentar a sua homogeneidade. Outro tipo de substituição de aminoácido é eliminar os pares de asparagina-glicina, que formam os locais de desamidação potenciais, mediante a alteração de um ou de ambos os resíduos. Isto é feito preferentemente em regiões estruturais, o domínio constante ou regiões não canónicas do anticorpo.

Activação de CD40 por Anticorpo Anti-CD40

O anticorpo anti-CD40 da invenção é um anticorpo de

activação, isto é, um agonista de CD40. Um anticorpo de activação amplifica ou substitui os efeitos de CD40L sobre CD40. Em alguns exemplos descritos no presente documento o anticorpo de activação é essencialmente um mimético de CD40L, e compete com CD40L para a ligação a CD40. Em algumas formas de realização, o anticorpo não compete com CD40L para a ligação a CD40, mas amplifica o efeito de ligação de CD40L a CD40. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 activa CD40 na presença ou ausência de CD40L.

Inibição de Crescimento Tumoral *In Vivo* por Anticorpos Anti-CD40

O anticorpo anti-CD40 da invenção inibe a proliferação de células tumorais *in vitro* ou crescimento tumoral *in vivo*.

Em algumas formas de realização, o anticorpo inibe o crescimento tumoral em pelo menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %. Em algumas formas de realização, o anticorpo inibe o crescimento tumoral em 75 %. Numa forma de realização, a inibição de crescimento tumoral é detectável 14 dias após tratamento inicial com o anticorpo. Em outras formas de realização, a inibição de crescimento tumoral é detectável 7 dias após tratamento inicial com o anticorpo. Em alguns exemplos descritos no presente documento, outro agente antineoplásico é administrado ao animal com o anticorpo anti-CD40. Como descrito no presente documento, o agente antineoplásico inibe adicionalmente o crescimento tumoral. Como descrito no presente documento, o agente antineoplásico pode ser adriamicina ou taxol. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a co-administração de um agente antineoplásico e o anticorpo anti-CD40 inibe o crescimento tumoral em pelo menos 50 %, após um período de 22-24 dias a partir do início do tratamento em comparação com o crescimento tumoral num animal não tratado.

Indução da Apoptose por Anticorpos Anti-CD40

Também se descreve no presente documento um anticorpo anti-CD40 que induz a morte celular de células CD40 positivas. Em alguns exemplos descritos no presente documento, o anticorpo causa a apoptose de células CD40 positivas *in vivo* ou *in vitro*.

Aumento da Expressão de Moléculas de Superfície Celular

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 aumenta a expressão de moléculas de superfície de célula B, incluindo, mas não limitado a ICAM, MHC-II, B7-2, CD71, CD23 e CD83. Em algumas formas de realização, 1 µg/ml do anticorpo aumenta expressão de ICAM num ensaio de regulação positiva de molécula de superfície de célula B de sangue completo em pelo menos 2 vezes, ou mais preferentemente em pelo menos 4 vezes. Em algumas formas de realização, 1 µg/ml do anticorpo aumenta a expressão de MHC-II num ensaio de regulação positiva de molécula de superfície de célula B de sangue completo em pelo menos 2 vezes, ou mais preferentemente em pelo menos 3 vezes. Em algumas formas de realização, 1 µg/ml do anticorpo aumenta a expressão de CD23 em ensaio de regulação positiva de molécula de superfície de célula B de sangue completo em pelo menos 2 vezes, ou mais preferentemente em pelo menos 5 vezes. Veja-se, por exemplo, Exemplo VII, Quadro 25.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 aumenta a expressão de moléculas de superfície de células dendríticas incluindo, mas não limitado a MHC-II, ICAM, B7-2, CD83 e B7-1. Em algumas formas de realização o intervalo de regulação positiva é similar ao intervalo de regulação positiva observado em células B. Veja-se, por exemplo, Quadros 25 e 26, *infra*. Em algumas formas de realização, o anticorpo regula positivamente preferentemente a expressão de moléculas de superfície de células dendríticas, tais como B7-2 e MHC-11, em comparação com a expressão de célula B destas moléculas. Veja-se, por exemplo, Quadro 27.

Aumento de Secreção de Citocinas Celulares

Em algumas formas de realização o anticorpo aumenta a secreção celular de citocinas incluindo, mas não limitado a IL-8, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23.

Em algumas formas de realização o anticorpo aumenta a secreção de citocina por células dendríticas e monócitos aderentes. Em algumas formas de realização a produção de citocina é aumentada ainda pela co-estimulação com um ou mais de LPS, SE- γ ou IL-1 β . Em ainda outro aspecto da invenção, o anticorpo com co-estimulação de LPS aumenta a produção de IL-12p70 num ensaio de célula dendrítica com um EC₅₀ de cerca de 0,48 μ g/ml. Em algumas formas de realização, o anticorpo aumenta a produção de IL-12p40 em células dendríticas com um EC₅₀ de cerca de 0,21 μ g/ml. (Veja-se, por exemplo, Exemplo VIII).

Em algumas formas de realização, o anticorpo aumenta a secreção de IFN-gama por células T num ensaio de célula dendrítica/célula T alogénica, como descrito no Exemplo VIII. Em algumas formas de realização, o anticorpo aumenta a secreção de IFN-gama num ensaio de célula dendrítica/célula T alogénica com um EC₅₀ de cerca de 0,3 μ g/ml. Em algumas formas de realização, o anticorpo aumenta a secreção de IFN-gama num ensaio de célula dendrítica/célula T alogénica com um EC₅₀ de cerca de 0,2 mg/ml. Numa forma de realização, o anticorpo aumenta a secreção de IFN-gama num ensaio de célula dendrítica/célula T alogénica com um EC₅₀ de cerca de 0,03 μ g/ml.

Métodos de Produção de Anticorpos e Linhas Celulares de Produção de Anticorpos

Como descrito no presente documento, os anticorpos humanos da invenção podem ser produzidos pela imunização de um animal não humano que compreende no seu genoma alguns ou todos os locais de cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina humana com um antígeno de CD40. Preferentemente o animal não humano é um animal XenoMouse™.

Os ratinhos XenoMouse™ são estirpes de ratinho planejadas que compreendem grandes fragmentos de locais de cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina humana e são deficientes na produção de anticorpos de ratinho. Veja-se, por exemplo, Green *et al.*, Nature Genetics 7:13-21 (1994) e Patentes US N° 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598, 6.130.364, 6.162.963 e 6.150.584. Veja-se também documento WO 91/10741, documento WO 94/02602, documento WO 96/34096, documento WO 96/33735, documento WO 98/16654, documento WO 98/24893, documento WO 98/50433, documento WO 99/45031, documento WO 99/53049, documento WO 00/09560, e documento WO 001037504.

Também se descreve no presente documento um método para produzir anticorpos anti-CD40 a partir de anticorpos de animais não humanos, não ratinhos mediante a imunização de animais transgênicos não humanos que compreendem locais de imunoglobulina humana com um antígeno de CD40. Pode-se produzir tais animais utilizando os métodos descritos nos documentos acima citados. Os métodos revelados nestes documentos podem ser modificados como descrito na Patente US 5.994.619. Os animais não humanos são ratinhos, ratos, ovinos, suínos, caprinos, bovinos e equinos.

Os ratinhos XenoMouse™ produzem um repertório humano semelhante a adulto de anticorpos completamente humanos e geram anticorpos humanos específicos ao antígeno. Em alguns exemplos, os ratinhos XenoMouse™ contêm aproximadamente 80 % do repertório de gene V de anticorpo humano através da introdução de fragmentos cromossoma artificial de levedura (YAC) de configuração de linha germinal de tamanho megabase do loci de cadeia pesada humana e loci capa de cadeia leve. Veja-se Mendez *et al.*, Nature Genetics 15:146-156 (1997), Green e Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998), e documento WO 98/24893.

Em algumas formas de realização, os animais não humanos que compreendem os genes da imunoglobulina humana

são animais que possuem uma imunoglobulina humana "minilocus". Na abordagem minilocus, um local Ig exógeno é imitado através da inclusão de genes individuais do local Ig. Assim, um ou mais genes V_H , um ou mais genes D_H , um ou mais genes J_H , um domínio constante μ , e um segundo domínio constante (preferivelmente um domínio constante γ) são formados numa construção para inserção num animal. Esta abordagem é descrita, *inter alia*, nas Patentes US N° 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, e 5.643.763.

Uma vantagem da abordagem de minilocus é a rapidez com que as construções incluindo porções do locus de Ig podem ser geradas e introduzidas em animais. No entanto, uma desvantagem potencial da abordagem de minilocus é que não pode haver diversidade de imunoglobulinas suficiente para suportar desenvolvimento de células B completo, tal que pode haver menor produção de anticorpos.

Também se descreve no presente documento um método para preparar anticorpos anti-CD40 humanizados. Em alguns exemplos descritos no presente documento, os animais não humanos são imunizados com um antígeno de CD40 conforme descrito a seguir sob condições que permitem a produção de anticorpos. Células produtoras de anticorpos são isoladas dos animais, fusionadas com mielomas para produzir hibridomas, e ácidos nucleicos que codificam as cadeias leve e pesada de um anticorpo anti-CD40 de interesse são isolados. Estes ácidos nucleicos são subsequentemente planejados utilizando as técnicas conhecidas pelos peritos na especialidade e como descrito mais a seguir para reduzir a quantidade de sequência não humana, isto é, humanizar o anticorpo para reduzir a resposta imunológica em seres humanos.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, o antígeno de CD40 é CD40 isolado e/ou purificado. Numa

forma de realização preferida, o antígeno de CD40 é CD40 humano. O antígeno de CD40 pode ser um fragmento de CD40. O fragmento de CD40 pode ser o domínio extracelular de CD40. O fragmento de CD40 pode compreender pelo menos um epítopo de CD40. O antígeno de CD40 pode também ser célula que expressa ou sobre-expressa CD40 ou um fragmento imunogénico do mesmo na sua superfície. Os antígenos de CD40 podem também ser uma proteína de fusão de CD40.

A imunização de animais pode ser feita por qualquer método conhecido na especialidade. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Nova Iorque: Cold Spring Harbor Press, 1990. Os métodos para imunizar animais não humanos tais como ratinhos, ratos, ovelha, cabras, porcos, gado e cavalos são bem conhecidos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, supra, e Patente US 5.994.619. O antígeno de CD40 pode ser administrado com um adjuvante para estimular a resposta imune. Os adjuvantes exemplares incluem adjuvante de Freund completo ou incompleto, RIBI (dipéptidos de muramilo) ou ISCOM (complexos imunoestimuladores). Tais adjuvantes podem proteger o polipéptido da dispersão rápida mediante o sequestro num depósito local, ou eles podem conter substâncias que estimulam o hospedeiro a segregar factores que são quimiotácticas para os macrófagos e outras porções do sistema imune. Preferivelmente, se um polipéptido estiver sendo administrado, o plano de imunização envolverá duas ou mais administrações do polipéptido, espalhadas ao longo de várias semanas.

O Exemplo I descreve a produção de anticorpos monoclonais anti-CD40.

Produção de Anticorpos e Linhas Celulares de Produção de Anticorpos

Após a imunização de um animal com um antígeno de CD40, os anticorpos e/ou células produtoras de anticorpos podem ser obtidos a partir do animal. Em alguns exemplos

descritos no presente documento, o soro contendo anticorpo anti-CD40 é obtido a partir do animal por hemorragia ou sacrifício do animal. O soro pode ser utilizado como é obtido do animal, uma fracção de imunoglobulina pode ser obtida do soro, ou os anticorpos anti-CD40 podem ser purificados a partir do soro. É bem conhecido a um perito ordinário na especialidade que o soro ou imunoglobulinas obtidas desta maneira serão policlonais. A desvantagem de fusionar anticorpos policlonais preparados a partir do soro é que a quantidade de anticorpos que pode ser obtida é limitada e o anticorpo policlonal tem um arranjo heterogéneo de propriedades.

Em alguns exemplos descritos no presente documento linhas celulares imortalizadas produtoras de anticorpos são preparadas a partir de células isoladas do animal imunizado. Após a imunização, o animal é sacrificado e nódulo linfático e/ou células B esplénicas são imortalizadas. Os métodos de imortalizar as células incluem, mas não são limitados a, transferência das mesmas com oncogenes, infecção das mesmas com o vírus oncogénico, cultivo das mesmas sob condições que seleccionam as células imortalizadas, submissão das mesmas aos compostos carcinogénicos ou mutantes, fusão das mesmas com uma célula imortalizada, por exemplo, uma célula de mieloma, e inactivação das mesmas com um gene supressor tumoral. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, supra. Se a fusão com células de mieloma for utilizada, as células de mieloma preferivelmente não segregam polipéptidos de imunoglobulina (uma linha celular não secretora). Células imortalizadas são rastreadas usando CD40, uma porção do mesmo, ou uma célula que expressa CD40. Como descrito no presente documento, o rastreio inicial pode ser realizado usando um imunoensaio ligado a enzima (ELISA) ou um radioimunoensaio. Um exemplo do rastreio ELISA é fornecido no documento WO 00/37504.

As células produtoras de anticorpos anti-CD40, por exemplo, hibridomas, são seleccionadas, clonadas e ainda submetidas ao rastreio com relação as características desejáveis, incluindo crescimento robusto, alta produção de anticorpos e características de anticorpo desejáveis, como debatido mais a seguir. Os hibridomas podem ser expandidos *in vivo* em animais singeneicos, em animais que carecem de um sistema imune, por exemplo, ratinhos nus, ou em cultura celular *in vitro*. Os métodos de selecção, clonagem e expansão de hibridomas são bem conhecidos daqueles de habilidade usual na técnica.

Como descrito no presente documento, o animal imunizado é um animal não humano que expressa os genes da imunoglobulina humana e as células B esplénicas são fundidas à uma linha celular de mieloma da mesma espécie como o animal não humano. Preferentemente, o animal imunizado é um ratinho XENOMOUSE™ e a linha de células de mieloma é um mieloma de ratinho não secretor. Como descrito no presente documento, a linha de células de mieloma é preferentemente P3-X63-AG8.653. Veja-se, por exemplo, Exemplo L

Em outro aspecto, a invenção proporciona hibridomas que produzem um anticorpo anti-CD40 humano. Numa forma de realização preferida, os hibridomas são hibridomas de ratinho, como descrito acima. Em outras formas de realização, os hibridomas são produzidos numa espécie não humana, não ratinho tal como ratos, ovinos, suínos, caprinos, bovinos e equinos. Em outra forma de realização, os hibridomas são hibridomas humanos.

Ácidos Nucleicos Vectores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes de Produção de Anticorpos

Ácidos Nucleicos

A presente invenção também abrange moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-CD40 da invenção. Em algumas formas de realização, diferentes moléculas de ácido

nucleico codificam uma cadeia pesada e uma cadeia leve de uma imunoglobulina anti-CD40 como reivindicada. Em outras formas de realização, a mesma molécula de ácido nucleico codifica uma cadeia pesada e uma cadeia leve de uma imunoglobulina anti-CD40.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico que codifica o domínio variável da cadeia leve compreende uma sequência de gene Vk humano A3/A19 (DPK-15), L5 (DP5) ou A27 (DPK-22) ou uma sequência derivada da mesma. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos de um gene Vk A3/A19 e um gene Jk1, Jk2 ou Jk3 ou sequências derivadas da mesma. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos de um gene Vk L5 e um gene Jk4. Em alguns exemplos a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos de um gene Vx A27 e pode ser um gene Jk3.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia leve, codifica uma sequência de aminoácidos que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mutações da sequência de aminoácidos de linha germinal. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos V_L que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 substituições não conservativas de aminoácidos e/ou 1, 2 ou 3 substituições não conservativas em comparação com a sequência de linha germinal. As substituições podem ser nas regiões CDR, as regiões estruturais ou no domínio constante.

Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico que codifica o domínio variável da cadeia leve (V_L) codifica uma sequência de aminoácidos V_L que compreende uma ou mais mutações em comparação com a

sequência de linha germinal que são idênticas às mutações encontradas na V_L do anticorpo 21.4.1. Também se descrevem sob este aspecto os anticorpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.12.10-8,3,15.1.1, 21,21, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 2328.1L-C92A, 23.29.1 e 24.2.1. Também se descrevem no presente documento moléculas de ácido nucleico que codificam pelo menos três mutações de aminoácidos em comparação com a sequência de linha germinal encontrada na V_L de um dos anticorpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 212,1, 22.1.1, 23-5,1. 23.25.1, 2328.1, 2328. 1L-C92A. 23.29.1 e 24.2.1.

Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico-compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos V_L do anticorpo monoclonal 21.4.1 (SEQ ID NO:44). Também se descrevem sob este aspecto o anticorpo monoclonal 3.1.1 (SEQ ID NO: 4), 3.1.1L-L4M-L83V (SEQ ID NO: 94), 7.1.2 (SEQ.ID NO: 12), 10.8.3 (SEQ ID NO: 20), 15.1.1 (SEQ ID NO: 28), 21.2.1 (SEQ ID NO: 36), 22.1.1 (SEQ ID NO: 52), 23.5.1 (SEQ ID NO: 60), 23.28.1 (SEQ ID NO: 68), 23-28.1L-C92A (SEQ ID NO: 100), 23.29.1 (SEQ ID NO: 76) ou 24.2.1 (SEQ ID NO: 84), ou uma porção do mesmo. Em alguns exemplos a dita porção compreende pelo menos a região CDR3. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico codifica a sequência de aminoácidos da cadeia leve CDRs do dito anticorpo. Em algumas formas de realização, a dita porção é uma porção contígua que compreende CDR1-CDR3.

Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:44 ou a dita sequência que não possui a sequência sinal. Também se descrevem sob este aspecto as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOS: 4,12, 20 28, 36. 52, 60, 68, 76, 84, 94 ou 100, ou a dita sequência que não possui a sequência sinal. Em algumas formas de realização preferidas a molécula de ácido

nucleico compreende a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 43 ou a dita sequência que não possui a sequência sinal. Também se descrevem sob este aspecto as sequências de nucleótidos das SEQ ID NOS: 3, 11, 19, 27, 35, 51, 59, 67, 75, 83, 93 ou 99, ou pode ser uma porção das mesmas, as ditas sequências opcionalmente não possuem a sequência sinal.

Em algumas formas de realização, a dita porção codifica uma região V_L . Em alguns exemplos descritos no presente documento, a dita porção codifica pelo menos a região CDR2. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico codifica a sequência de aminoácidos das CDRs de cadeia leve do dito anticorpo. Em algumas formas de realização, a dita porção codifica uma região contígua da CDR1-CDR3.

Em alguns exemplos, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos V_L que é pelo menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %; 95 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma sequência de aminoácidos V_L de qualquer um dos anticorpos 3.1.1, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 ou 24.2.1, ou uma sequência de aminoácidos V_L de qualquer uma das SEQ ID NOS: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 ou 100. Numa forma de realização preferida, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos V_L idêntica à sequência de aminoácidos V_L do anticorpo 21.4.1 ou à SEQ ID NO:44. Também se descrevem no presente documento moléculas de ácido nucleico que hibridam sob condições altamente restritivas, tais como aquelas descritas acima, a uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOS: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94 ou 100, ou que tem a sequência de ácido nucleico das SEQ ID NOS: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93 ou 99.

Em outra forma de realização o ácido nucleico codifica uma cadeia leve de comprimento total do anticorpo 21.4.1. Também se descrevem sob este aspecto os anticorpos de 3.1.1, 3.1.1L-LAM-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.IL-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K ou 24.2.1. Em outra forma de realização, o ácido nucleico codifica uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48. Também se descrevem sob este aspecto SEQ ID NOS: 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 94, 100 ou 102, ou uma cadeia leve que compreende uma mutação, tal como uma revelada no presente documento. Além disso, o ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleótidos das SEQ ID NOS: 7, 15, 23, 31, 39, 47, 55, 63, 71, 79 ou 87, ou uma molécula de ácido nucleico que codifica uma cadeia leve que compreende uma mutação, tal como uma revelada no presente documento.

Como descrito no presente documento a molécula de ácido nucleico pode codificar o domínio variável da cadeia pesada (V_H) que compreende uma sequência de gene V_H humano 3-30+, 4-59, 1-02, 4.35 ou 3-30.3 ou uma sequência derivada da mesma. Em várias formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende um gene V_H humano 3-30+, um gene D4 (DIR3) e um gene humano J_H6 ; um gene humano 3-30+, um gene V_H humano D1-26 (DIR5) e um gene humano J_H6 ; um gene humano 4,35, um gene V_H humano DIR3 e um gene humano J_H6 ; um gene humano 4-59, um gene V_H humano D4-23 e um gene humano J_H4 ; um gene humano 1-02, um gene V_H humano DLR1 e um gene humano J_H4 ; um gene humano 3-30+, um gene V_H humano D6-19 (DIR3) e um gene humano J_H4 ; um gene humano 3-30+, um gene V_H humano D1-1 e um gene humano J_H6 ; um gene humano 3-30+, um gene V_H humano D4-17 e um gene humano J_H6 ; um gene humano 3-30.3, um gene V_H humano D4-17 e um gene humano J_H6 ; um gene humano 4-59, um gene V_H humano D4-17 (DIR1) e um gene humano J_H5 ou sequência derivada a partir dos genes

humanos.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos que compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7; 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ou 18 mutações em comparação com a sequência de aminoácidos de linha germinal dos genes humanos V, D ou J. Em alguns exemplos descritos no presente documento, as ditas mutações são na região V_H. Em algumas formas de realização, as ditas mutações são nas regiões CDR.

Como descrito no presente documento, a molécula de ácido nucleico pode codificar uma ou mais mutações de aminoácidos em comparação com a sequência de linha germinal que são idênticas às mutações de aminoácidos encontradas na V_H de anticorpo monoclonal 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 ou 24.2.1. Em alguns exemplos, o ácido nucleico codifica pelo menos três mutações de aminoácidos em comparação com as sequências de linha germinal que são idênticas a pelo menos três mutações de aminoácidos encontradas num dos anticorpos monoclonais listados acima.

Em alguns exemplos descritos no presente documento a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica pelo menos uma porção da sequência de aminoácidos V_H de anticorpo 3.1.1 (SEQ ID NO: 2), 3.1.1H-A78T (SEQ ID NO: 90), 3.1.1H-A78T-V88A-V97A (SEQ ID NO: 92), 7.1.2 (SEQ ID NO: 10), 10.8.3 (SEQ ID NO: 18), 15.1.1 (SEQ ID NO: 26), 21.2.1 (SEQ ID NO: 34), 21.4.1 (SEQ ID NO: 42), 22.1.1 (SEQ ID NO: 50), 22.1.1H-C109A (SEQ ID NO: 96), 23.5.1 (SEQ ID NO: 58), 23.28.1 (SEQ ID NO: 66), 23.28.1H-D16E (SEQ ID NO: 98), 23.29.1 (SEQ ID NO: 74) ou 24.2.1 (SEQ ID NO: 82), ou a dita sequência que tem mutações conservativas de aminoácidos e/ou um total de três ou menos substituições não conservativas de aminoácidos. Em

vários exemplos descritos no presente documento, a sequência codifica uma ou mais regiões CDR, preferentemente uma região CDR3, todas as três regiões CDR, uma porção contígua incluindo CDR1-CDR3, ou a região V_H inteira, com ou sem uma sequência sinal.

Em algumas formas de realização, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 ou a dita sequência que não possui a sequência sinal. Também se descrevem sob este aspecto as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 34, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 e 98, ou a dita sequência que não possui a sequência sinal. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico compreende pelo menos uma porção da sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 1. 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 ou 97, ou a dita sequência que não possui a sequência sinal. Em alguns exemplos descritos no presente documento, a dita porção codifica a região V_H (com ou sem uma sequência sinal). Uma região CDR3, todas as três regiões CDR, ou uma região contígua incluindo CDR1-CDR3.

Em alguns exemplos descritos no presente documento, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos V_H que é pelo menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, ou 99 % idêntica às sequências de aminoácidos V_H mostradas nas Figs. 1A-1C ou 2A-2C ou a uma sequência de aminoácidos V_H de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 ou 98. Numa forma de realização preferida, a molécula de ácido nucleico codifica uma sequência de aminoácidos V_H idêntica à sequência de aminoácidos V_H da SEQ ID NO: 42. As moléculas de ácido nucleico descritas no presente documento incluem ácidos nucleicos que hibridam sob condições altamente restritivas, tais como aquelas descritas acima, a uma sequência de ácido nucleico que codifica a sequência

de aminoácidos das SEQ ID NOS: 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96 ou 98, ou que tem a sequência de ácido nucleico das SEQ ID NOS: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95 ou 97. Numa forma de realização da invenção o ácido nucleico tem a sequência de ácido nucleico da SEQ ID NO: 41. Também descrito são moléculas de ácido nucleico que hibridam sob condições altamente restritivas, tais como aquelas descritas acima, a uma sequência de ácido nucleico que codifica uma V_H descrita imediatamente acima.

Em outra forma de realização, o ácido nucleico codifica uma cadeia pesada de comprimento total de anticorpo 21.4.1 ou uma cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46. Também se descrevem sob este aspecto ácidos nucleicos que codificam uma cadeia pesada de comprimento total de um anticorpo seleccionado a partir de 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A, V97A, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 e 24.2.1, ou uma cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOS: 6, 14, 22, 30, 38, 54, 62, 70, 78 ou 86, ou uma cadeia pesada que compreende uma mutação, tal como uma das mutações discutidas no presente documento. Em outra forma de realização, o ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 45. Descreve-se ainda no presente documento que o ácido nucleico pode compreender a sequência de nucleótidos das SEQ ID NOS: 5, 13, 21, 29, 37, 53, 61, 69, 77, 85 ou 89, ou uma molécula de ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada que compreende uma mutação, tal como uma das mutações discutidas no presente documento.

Uma molécula de ácido nucleico que codifica a cadeia pesada ou leve inteira de um anticorpo anti-CD40 ou suas porções pode ser isolada de qualquer fonte que produza tal anticorpo. Como descrito no presente documento, as

moléculas de ácido nucleico da invenção podem ser isoladas de uma célula B isolada de um animal imunizado com CD40 ou de uma célula imortalizada derivada a partir de tal célula B que expressa um anticorpo anti-CD40. Os métodos de isolamento de ARNm que codifica um anticorpo são bem conhecidos na especialidade. Veja-se, por exemplo, Sambrook *et al.* O ARNm pode ser isolado e utilizado para produzir ADNc para utilização na reacção de cadeia polimerase (PCR) ou clonagem de ADNc de genes de anticorpo. Preferentemente, a molécula de ácido nucleico é isolada de um hibridoma que tem como um dos seus parceiros de fusão uma célula produtora de imunoglobulina humana de um animal transgénico não humano. Preferentemente, a célula produtora de imunoglobulina humana é isolada de um animal XenoMouse™. Como também descrito no presente documento, a célula produtora de imunoglobulina humana é de um animal transgénico não humano, não ratinho, como descrito acima. Também se descreve no presente documento que o ácido nucleico pode ser isolado de um animal não humano, não transgénico. As moléculas de ácido nucleico isoladas de um animal não humano, não transgénico podem ser usadas, por exemplo, para anticorpos humanizados.

Em algumas formas de realização, um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo anti-CD40 da invenção pode compreender uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio V_H da invenção unida estruturalmente a uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio constante de cadeia pesada de qualquer fonte. Do mesmo modo, uma molécula ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de um anticorpo anti-CD40 da invenção pode compreender uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio V_L da invenção unida estruturalmente a uma sequência de nucleótidos que codifica um domínio constante de cadeia leve de qualquer fonte.

Num outro aspecto da invenção, as moléculas de ácido

nucleico que codificam o domínio variável das cadeias pesadas (V_H) e/ou leves (V_L) são "convertidas" em genes de anticorpo de comprimento total. Numa forma de realização, as moléculas de ácido nucleico que codificam os domínios V_H ou V_L são convertidas em genes de anticorpo de comprimento total mediante a inserção numa expressão vector que codifica anteriormente os domínios constantes de cadeia pesada (C_H) ou constantes de cadeia leve (C_L), respectivamente, de tal forma que o segmento V_H está operativamente ligado ao(s) segmento(s) C_H dentro do vector, e/ou o segmento V_L está operativamente ligado ao segmento C_L dentro do vector. Em outra forma de realização, as moléculas de ácido nucleico que codificam os domínios V_H e/ou V_L são convertidas em genes de anticorpo de comprimento total através da união, por exemplo, ligação, de uma molécula de ácido nucleico que codifica um domínio V_H e/ou V_L a uma molécula de ácido nucleico que codifica um domínio C_H e/ou C_L usando técnicas biomoleculares padrão. As sequências de ácido nucleico de genes de domínio constante da imunoglobulina de cadeia pesada e leve são conhecidas na técnica. Veja-se, por exemplo, Kabat *et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed., NIH Publ. N° 91-3242, 1991. As moléculas de ácido nucleico que codificam as cadeias pesadas e/ou leves de comprimento total podem, então, ser expressas a partir de uma célula em que elas foram introduzidas e o anticorpo anti-CD40 isolado.

As moléculas de ácido nucleico podem ser usadas para recombinantemente expressar grandes quantidades de anticorpos anti-CD40. As moléculas de ácido nucleico também podem ser utilizadas para produzir anticorpos quiméricos, anticorpos biespecíficos, anticorpos de cadeia única, imunoadesinas, diacorpos, anticorpos transformados e derivados de anticorpo, como descrito mais a seguir. Se as moléculas de ácido nucleico forem derivadas de um animal

não humano, não transgênico, as moléculas de ácido nucleico podem ser utilizadas para a humanização de anticorpos, também como será descrito a seguir.

Também se descreve no presente documento a utilização de molécula de ácido nucleico da invenção como uma sonda ou iniciador de PCR para uma sequência de anticorpo específica. Por exemplo, o ácido nucleico pode ser usado como uma sonda em métodos de diagnóstico ou como um iniciador de PCR para amplificar as regiões de ADN que podem ser utilizadas, entre outros, para isolar as moléculas de ácido nucleico adicionais que codificam os domínios variáveis de anticorpos anti-CD40. Em alguns exemplos descritos no presente documento, as moléculas de ácido nucleico são oligonucleótidos. Em alguns exemplos descritos no presente documento, os oligonucleótidos são domínios altamente variáveis das cadeias leves e pesadas do anticorpo de interesse. Em alguns exemplos, os oligonucleótidos codificam toda ou uma parte de uma ou mais das CDRs de anticorpo. 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 ou 24.2.1.

Vectores

A invenção proporciona vectores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada de um anticorpo anti-CD40 da invenção ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo. A invenção proporciona também vectores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam a cadeia leve de tais anticorpos ou porção de ligação a antígeno dos mesmos. Também descritos no presente documento estão vectores que compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam as proteínas de fusão, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpo, e sondas destas.

Em algumas formas de realização, os anticorpos anti-CD40, ou porções de ligação a antígeno da invenção são

expressos através da inserção de ADN que codificam as cadeias leves e pesadas de comprimento parcial ou total, obtidas como descrito acima, em vectores de expressão tais que os genes são operativamente ligados às necessárias sequências de controlo de expressão tais como as sequências de controlo transcrpcionais e traducionais. Os genes de anticorpo são inseridos no vector de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação dos locais de restrição complementares sobre o fragmento genético de anticorpo e vectores, ou ligação final abrupta se nenhum local de restrição estiver presente). O gene de anticorpo é ligado num vector tal que as sequências de controlo transcrpcionais e traducionais dentro do vector servem à sua função destinada de regulação da transcrição e translação do gene de anticorpo. O vector de expressão e as sequências de controlo da expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve de anticorpo e o gene de cadeia pesada de anticorpo podem ser inseridos em vectores separados. Numa forma de realização preferida, ambos os genes são inseridos no mesmo vector de expressão. Os genes de anticorpo são inseridos no vector de expressão por métodos padrão (por exemplo, ligação dos locais de restrição complementares sobre o fragmento genético de anticorpo e vectores, ou ligação final abrupta se nenhum local de restrição estiver presente).

Um vector conveniente é aquele que codifica uma sequência de imunoglobulina C_H ou C_L humana funcionalmente completa, com os locais de restrição apropriados planeados de modo que qualquer sequência de V_H ou V_L possa facilmente ser inserida e expressa, como descrito acima. Em tais vectores, junção geralmente ocorre entre o local doador da junção na região J inserida e o local aceitante da junção precedendo o domínio C humano, e também nas regiões de junção que ocorrem dentro dos exões C_H humanos. O término

da poliadenilação e transcrição ocorre nos locais cromossómicos nativos a jusante das regiões de codificação. O vector de expressão recombinante também pode codificar um péptido sinal que facilita a secreção da cadeia de anticorpo de uma célula hospedeira. O gene de cadeia de anticorpo pode ser clonado no vector tal que o péptido sinal é ligado na grelha ao amino terminal da cadeia de imunoglobulina. O péptido de sinal pode ser um péptido de sinal da imunoglobulina ou um péptido de sinal heterólogo (isto é, um péptido de sinal de uma proteína não imunoglobulina).

Além dos genes de cadeia de anticorpo, os vectores de expressão recombinantes da invenção transportam sequências reguladoras que controlam a expressão dos genes da cadeia de anticorpo numa célula hospedeira. Será apreciado pelos peritos na especialidade que o projecto do vector de expressão, incluindo a selecção de sequências reguladoras pode depender de tais factores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão de proteína desejado, etc. Sequências reguladoras preferidas para a expressão de célula hospedeira de mamíferos incluem elementos virais que direccionam níveis altos de expressão de proteínas em células de mamíferos, tais como promotores e/ou potenciadores derivados a partir de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tal como o promotor/potenciador de CMV), Vírus dos Símios 40 (SV40) (tal como o promotor/potenciador de SV40), adenovírus, (por exemplo, o promotor principal tardio de adenovírus (AdMLP)), polioma e fortes promotores de mamíferos tais como imunoglobulina nativa e promotores de actina. Para mais descrição de elementos reguladores virais, e sequências dos mesmos, veja-se, por exemplo, Patente US N° 5.168.062, Patente US N° 4.510.245 e Patente US N° 4.968.615. Os métodos para expressar anticorpos em plantas, incluindo uma descrição de promotores e vectores, bem como transformação de plantas

são conhecidos na especialidade. Veja-se, por exemplo, a Patente US N° 6.517.529. Os métodos de expressar polipéptidos em células bacterianas ou células fúngicas, por exemplo, células de levedura, também são bem conhecidos na técnica.

Além dos genes de cadeia de anticorpos e sequências reguladoras, os vectores de expressão recombinante da invenção podem carregar sequências adicionais, tais como sequências que regulam a replicação do vector nas células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores seleccionáveis. O gene marcador seleccionável facilita a selecção de células hospedeiras em que o vector foi introduzido (veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 4.399.216, 4.634.665, 5.179.017). Por exemplo, tipicamente o gene marcador seleccionável confere resistência aos medicamentos, tais como G418, higromicina ou metotrexato, numa célula hospedeira em que o vector foi introduzido. Os genes marcadores seleccionáveis preferidos incluem o gene diidrofolato reductase (DHFR) (para utilização em células hospedeiras do dhfr com selecção/amplificação de metotrexato), o neo gene (para selecção G418), e o gene glutamato sintetase.

Células Hospedeiras de Não Híbridomas e Métodos de Produzir Recombinantemente Proteína

As moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-CD40 e vectores que compreendem estas moléculas de ácido nucleico podem ser usadas para a transfecção de uma célula hospedeira adequada de mamífero, planta, bacteriana ou levedura. A transformação pode ser feita por qualquer método conhecido para a introdução de polinucleótidos numa célula hospedeira. Os métodos para a introdução de polinucleótidos heterólogos em células de mamífero são bem conhecidos na técnica e incluem a transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibreno, a fusão

protoplástica, electroporação, encapsulamento do(s) polinucleótido(s) em lipossomas, e micro-injecção directa do ADN em núcleos. Além disso, as moléculas de ácido nucleico podem ser introduzidas nas células de mamífero por vectores virais. Os métodos de transformar células são bem conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Patentes US N° 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, e 4.959.455. Os métodos de transformar células vegetais são bem conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, a transformação mediada por *Agrobacterium*, transformação biolística, injecção directa, electroporação e transformação viral. Os métodos de transformar células bacterianas e de levedura também são bem conhecidos na técnica.

As linhas de células de mamífero disponíveis como hospedeiros para expressão são bem conhecidas na técnica e incluem muitas linhas celulares imortalizadas disponíveis da Colecção Americana de Culturas Celulares (ATCC). Estas incluem, entre outros, células do ovário de hamster chinês (CHO), células NSO, células SP2, células HeLa, células renais de hamster bebé (BHK), células renais de macaco (COS), células do carcinoma hepatocelular humanas (por exemplo, Hep G2), células A549, e várias outras linhas celulares. As linhas celulares de preferência particular são seleccionadas através da determinação de quais linhas celulares possuem níveis de expressão elevados. Outras linhas celulares que podem ser utilizadas são linhas celulares de insecto, tais como células Sf9. Quando os vectores de expressão recombinantes que codificam os genes de anticorpo forem introduzidos em células hospedeiras de mamífero, os anticorpos são produzidos pelo cultivo das células hospedeiras por um período de tempo suficiente para levar em conta a expressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferivelmente, secreção do anticorpo no meio de cultura em que as células hospedeiras são cultivadas. Os anticorpos podem ser recuperados a partir do

meio de cultura, utilizando métodos de purificação de proteína padrão. As células hospedeiras de planta incluem, por exemplo, *Nicotiana*, *Arabidopsis*, lentilha d'água, milho, trigo, batata, etc. As células hospedeiras bacterianas incluem espécies *E. coli* e *Streptomyces*. As células hospedeiras de levedura incluem *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*.

Além disso, a expressão de anticorpos da invenção (ou outras fracções dos mesmos) a partir da produção de linhas celulares pode ser reforçada usando várias técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão genética de sintetase de glutamina (o sistema GS) é uma abordagem comum para reforçar a expressão sob certas condições. O sistema GS é debatido no todo ou em parte em conexão com as Patentes Europeias N° 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997, 0 338 89303964.4.

É provável que os anticorpos expressos por diferentes linhas celulares ou em animais transgênicos terão diferentes glicosilação uns com os outros. No entanto, todos os anticorpos codificados pelas moléculas de ácido nucleico aqui fornecidas, ou que compreende as sequências de aminoácidos aqui fornecidas são parte da presente invenção, independente da glicosilação dos anticorpos.

Animais e Plantas Transgênicas

Os anticorpos anti-CD40 da invenção também podem ser produzidos de maneira transgênica através da geração de um mamífero ou planta que é transgênica com relação as sequências de cadeia pesada e leve da imunoglobulina de interesse e produção do anticorpo numa forma recuperável. Em conexão com a produção transgênica em mamíferos, os anticorpos anti-CD40 podem ser produzidos, e recuperados, no leite de cabras, vacas, ou de outros mamíferos. Veja-se, por exemplo, as Patentes US N° 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, 5.741.957. Em algumas formas de realização, os animais transgênicos não humanos que compreendem locais de

imunoglobulina humana são imunizados com CD40 ou uma porção imunogénico desta, como descrito acima. Os métodos para a produção de anticorpos em plantas são descritos, por exemplo, nas Patentes US N° 6.046.037 e 5.959.177.

Em algumas formas de realização, os animais transgénicos não humanos ou plantas são produzidos através da introdução de uma ou mais moléculas de ácido nucleico que codificam um anticorpo anti-CD40 da invenção nos animais ou plantas mediante técnicas transgénicas padrão. Veja-se Hogan e Patente US N° 6.417.429, *supra*. As células transgénicas utilizadas para a produção de animais transgénicos podem ser células estaminais embrionárias ou células somáticas. Os organismos não humanos transgénicos podem ser quiméricos, heterozigotos não quiméricos e homozigotos não quiméricos. Veja-se, por exemplo, Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* 2^a ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, *Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach*, Oxford University Press (2000); e Pinkert, *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*, Academic Press (1999). Em algumas formas de realização, os animais transgénicos não humanos têm uma disrupção direccionada e substituição por uma construção direccionada que codifica uma cadeia pesada e/ou uma cadeia leve de interesse. Numa forma de realização preferida, os animais transgénicos compreendem e expressam moléculas de ácido nucleico que codificam cadeias leve e pesada que se ligam especificamente a CD40, preferentemente CD40 humano. Em algumas formas de realização, os animais transgénicos compreendem moléculas de ácido nucleico que codificam um anticorpo modificado tal como um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Os anticorpos anti-CD40 podem ser produzidos em qualquer animal transgénico. Numa forma de realização preferida, os animais não humanos são ratinhos, ratos, ovinos, suínos, caprinos, bovinos e

equinos. O animal transgênico não humano expressa ditos polipéptidos codificados no sangue, leite, urina, saliva, lágrima, muco e outros fluidos corporais.

Bibliotecas de Apresentação em Fagos

Também se descreve no presente documento um método para produzir um anticorpo anti-CD40 ou porção de ligação a antígeno do mesmo que compreende as etapas de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos em fago, fazer o rastreo da biblioteca com CD40 ou uma porção do mesmo, isolar o fago que se liga à CD40, e obter o anticorpo do fago. Por meio de exemplo, um método para preparar da biblioteca de anticorpos para utilização nas técnicas de apresentação em fagos (phage display) compreende as etapas de imunizar um animal não humano que compreende locais de imunoglobulina humana com CD40 ou uma porção antigénica deste para criar uma resposta imunológica, extraíndo as células produtoras de anticorpo do animal imunizado; isolar o ARN das células extraídas, inverter transcrevendo o ARN para produzir ADNc, amplificar o ADNc utilizando um iniciador, e inserir o ADNc num vector de apresentação em fagos tal que os anticorpos sejam expressos no fago. Os anticorpos anti-CD40 recombinantes da invenção podem ser obtidos desta forma.

Os anticorpos anti-CD40 humanos recombinantes da invenção podem ser isolados mediante o rastreo de uma biblioteca de anticorpo combinatória recombinante. Preferentemente a biblioteca é uma biblioteca de apresentação em fagos scFv, gerada usando ADNc humanos V_L e V_H preparados a partir do ARNm isolado das células B. Os métodos para a preparação e rastreo de tais bibliotecas são conhecidos na técnica. Existem kits comercialmente disponíveis para gerar bibliotecas de apresentação em fagos (por exemplo, o *Pharmacia Recombinant Phage Antibody System*, n° de catálogo 27-9400-01; e o kit de apresentação em fagos SurfZAP™ de Stratagene, n° de catálogo 240612).

Há também outros métodos e reagentes que podem ser utilizados na geração e rastreio das bibliotecas de visualização de anticorpos (veja-se, por exemplo, a Patente US N° 5.223.409; Publicações PCT N° WO 92/18619, documento WO 91/17271, documento WO 92/20791, documento WO 92/15679, documento WO 93/01288, documento WO 92/01047, documento WO 92/09690; Fuchs *et al.*, Bio/Technology 9: 1370-1372 (1991); Hay *et al.*, Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81-85 (1992); Huse *et al.*, Science 246: 1275-1281 (1989); McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-554 (1990); Griffiths *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993); Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226: 889-896 (1992); Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991); Gram *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576-3580 (1992); Garrad *et al.*, Bio/Technology 9: 1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, Nuc. Ácido Res. 19: 4133-4137 (1991); e Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982 (1991).

Num exemplo descrito no presente documento, para isolar um anticorpo anti-CD40 humanos com as características desejadas, um anticorpo anti-CD40 humano como se descreve no presente documento primeiro usado para seleccionar sequências de cadeia leve e pesada humanas que têm actividade de ligação a CD40 similares, usando o métodos de impressão de epítomos descritos na Publicação PCT N° WO 93/06213. As bibliotecas de anticorpo usadas neste método são preferentemente bibliotecas de scFv preparadas e rastreadas como descrito na Publicação PCT N° WO 92/01047, McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-554 (1990); e Griffiths *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). As bibliotecas de anticorpo scFv preferivelmente são submetidas ao rastreio usando CD40 humano como o antígeno.

Assim que os domínios V_L e V_H humanos são seleccionados, as experiências de "mistura e comparação" são realizadas, em que diferentes pares dos segmentos V_L e V_H inicialmente seleccionados são submetidos o rastreio com

relação a ligação de CD40 para seleccionar as combinações de pares V_L/V_H preferida. Adicionalmente, para ainda melhorar a qualidade do anticorpo, os segmentos V_L e V_H do(s) par(es) V_L/V_H preferido(s) podem ser aleatoriamente transformados, de preferência dentro da região CDR3 de V_H e/ou V_L , num processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável pela maturação por afinidade de anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação por afinidade *in vitro* pode ser executada pela amplificação dos domínios V_H e V_L usando iniciadores da PCR complementares à CDR3 de V_H ou à CDR3 de V_L , respectivamente, cujos iniciadores foram "bloqueados" com uma mistura aleatória das quatro bases de nucleótido em certas posições tal que os produtos da PCR resultantes codificam os segmentos V_H e V_L em que as mutações aleatórias foram introduzidas nas regiões CDR3 V_H e/ou V_L . Estes segmentos V_H e V_L aleatoriamente transformados podem ser reexaminados com relação a ligação ao CD40.

Após o rastreio e isolamento de um anticorpo anti-CD40 da invenção de uma biblioteca de visualização de imunoglobulina recombinante, os ácidos nucleicos que codificam o anticorpo seleccionado podem ser recuperados da embalagem visor (por exemplo, a partir do genoma fago) e subclonados em outros vectores de expressão por técnicas de ADN recombinantes padrão. Se desejado, o ácido nucleico pode ainda ser manipulado para criar outras formas de anticorpo da invenção, como será descrito a seguir. Para expressar um anticorpo humano recombinante isolado pelo rastreio de uma biblioteca combinatória, o ADN que codifica o anticorpo é clonado num vector de expressão recombinante e introduzido numa célula hospedeira de mamífero, como descrito acima.

Mudança de classe

Outro aspecto da invenção proporciona um método para converter a classe ou subclasse de um anticorpo anti-CD40 a

outra classe ou subclasse. Em algumas formas de realização, uma molécula de ácido nucleico que codifica uma V_L ou V_H que não inclui quaisquer sequências de ácido nucleico que codificam C_L ou C_H é isolada usando métodos bem conhecidos na especialidade. A molécula de ácido nucleico então é operativamente ligada a uma sequência de ácido nucleico que codifica um C_L ou C_H de uma classe ou subclasse de imunoglobulina desejada. Isto pode ser obtido usando um vector ou molécula de ácido nucleico que compreende uma cadeia C_L ou C_H , como descrito acima. Por exemplo, um anticorpo anti-CD40 que foi originalmente IgM pode ser conectado a uma IgG. Além disso, a comutação de classe pode ser utilizada para converter uma subclasse IgG em outra, por exemplo, a partir de IgG1 para IgG2. Outro método para produzir um anticorpo da invenção que compreende um isotipo desejado compreende as etapas de isolamento de um ácido nucleico que codifica uma cadeia pesada de um anticorpo anti-CD40 e um ácido nucleico que codifica uma cadeia leve de um anticorpo anti-CD40, isolamento da sequência que codifica a região V_H , ligação da sequência V_H a uma sequência que codifica um domínio constante de cadeia pesada do isotipo desejado, que expressa o gene de cadeia leve e a construção de cadeia pesada numa célula, e colheita do anticorpo anti-CD40 com o isotipo desejado.

Anticorpos Desimunizados

Outro modo de produzir anticorpos com imunogenicidade reduzida é a desimunização de anticorpos. Como descrito no presente documento, o anticorpo pode ser desimunizado usando as técnicas descritas em, por exemplo, Publicações PCT N° WO98/52976 e WO00/34317.

Anticorpos Mutados

Como descrito no presente documento, as moléculas de ácido nucleico, vectores e células hospedeiras podem ser utilizadas para produzir anticorpos anti-CD40 mutados. Numa forma de realização preferida, as mutações são feitas num

domínio variável. Por exemplo, uma mutação pode ser feita numa ou mais das regiões de CDR para aumentar ou diminuir a K_D do anticorpo com relação a CD40, para aumento ou diminuir a k_{off} , ou alterar a especificidade de ligação do anticorpo.

As técnicas na mutagénese direccionada ao local são bem conhecidas na técnica. Veja-se, por exemplo, Sambrook *et al.* e Ausubel *et al.*, supra. Como descrito no presente documento, as mutações são feitas num resíduo de aminoácido que é conhecido como sendo alterado em comparação com a linha germinal num domínio variável de um anticorpo anti-CD40. Também se descreve no presente documento que uma ou mais mutações podem ser feitas num resíduo de aminoácido que é conhecido como sendo alterado em comparação com a linha germinal numa região CDR ou região estrutural de um domínio variável, ou num domínio constante de um anticorpo monoclonal 3.1.1, 3.1.1HA78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-LAM-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 221.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1. Como também descrito no presente documento, uma ou mais mutações são feitas num resíduo de aminoácido que é conhecido como sendo alterado em comparação com a linha germinal numa região CDR ou região estrutural de um domínio variável de uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir das SEQ ID NOS: 4, 12, 20, 28, 36, 44, 52, 60, 68, 76, 84, 94, 100, 102, 2, 10, 18, 26, 34, 42, 50, 58, 66, 74, 82, 90, 92, 96, 98, 100 ou 102, ou cuja sequência de ácido nucleico está apresentada nas SEQ ID NOS: 3, 11, 19, 27, 35, 43, 51, 59, 67, 75, 83, 93, 99, 101, 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 91, 95, 97, 99 ou 101.

Num exemplo descrito no presente documento, a região estrutural é transformada de modo que a(s) região(ões) estruturais resultantes possui(em) a sequência de aminoácido do gene da linha germinal correspondente. Uma

mutação pode ser feita numa região estrutural ou domínio constante para aumentar a semivida do anticorpo anti-CD40. Veja-se, por exemplo, Publicação PCT N° WO 00/09560. Uma mutação numa região estrutural ou domínio constante também pode ser feita para alterar a imunogenicidade do anticorpo, para proporcionar um local para a ligação covalente ou não covalente a outra molécula, ou para alterar tais propriedades como fixação de complemento, ligação de FcR e ADCC. De acordo com a invenção, um único anticorpo pode ter mutações em qualquer uma ou mais das regiões estruturais, do domínio constante e nas regiões variáveis.

Alguns exemplos descritos no presente documento, existem de 1 a 18, incluindo qualquer número no intervalo, as mutações de aminoácido nos domínios V_H ou V_L do anticorpo anti-CD40 mutado em comparação com o anticorpo anti-CD40 antes da mutação. Em qualquer um do acima, as mutações podem ocorrer numa ou mais regiões de CDR. Além disso, qualquer uma das mutações podem ser substituições de aminoácido conservativas. Em algumas formas de realização, não há mais do que 5, 4, 3, 2, ou 1 mudança de aminoácido nos domínios constante.

Anticorpos Modificados

Em outro exemplo descrito no presente documento, um anticorpo de fusão ou imunoadesina podem ser produzidos o que compreende todo ou uma parte de um anticorpo anti-CD40 da invenção ligada a outro polipéptido. Num exemplo, apenas os domínios variáveis do anticorpo anti-CD40 são ligados ao polipéptido. Em outro exemplo preferido, o domínio V_H de um anticorpo anti-CD40 é ligado a um primeiro polipéptido, enquanto o domínio V_L de um anticorpo anti-CD40 é ligada a um segundo polipéptido que se associa com o primeiro polipéptido de uma maneira tal que os domínios V_H e V_L podem interagir um com o outro para formar um local de ligação a anticorpo. Em outra forma de realização preferida, o domínio V_H é separado do domínio V_L por um

articulador tal que os domínios V_H e V_L podem interagir um com o outro (veja-se a seguir sob Anticorpos de Cadeia Única). O anticorpo V_H -ligante- V_L é então ligado ao polipéptido de interesse. O anticorpo de fusão é útil para direccionar um polipéptido a um tecido ou célula que expressa CD40. O polipéptido pode ser um agente terapêutico, tal como uma toxina, factor de crescimento ou outra proteína reguladora, ou pode ser um agente de diagnóstico, tal como uma enzima que pode ser facilmente visualizada, tal como peroxidase de rábano silvestre. Além disso, os anticorpos de fusão podem ser criados em que dois (ou mais) anticorpos de cadeia simples são ligados um ao outro. Isto é útil se alguém quiser criar um anticorpo divalente ou polivalente numa cadeia de polipéptido única, ou se alguém quiser criar um anticorpo biespecífico.

Para criar um anticorpo de cadeia única, (scFv), os fragmentos de ADN codificadores de V_H e V_L são operativamente ligados a outro fragmento que codifica um articulador flexível, por exemplo, que codifica a sequência de aminoácidos $(Gly_4-Ser)_3$, tal que as sequências de V_H e V_L podem ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com os domínios V_L e V_H unidos pelo articulador flexível. Veja-se, por exemplo, Bird *et al.*, Science 242: 423-426 (1988); Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883 (1988); McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-554 (1990). Os anticorpos de cadeia única podem ser monovalentes, se apenas um V_H e V_L isolados for utilizado, bivalente, se dois V_H e V_L forem utilizados, ou polivalente, se mais do que dois V_H e V_L forem utilizados. Os anticorpos biespecíficos ou polivalentes podem ser gerados os quais se ligam especificamente à CD40 e a uma outra molécula.

Em outros exemplos descritos no presente documento, outros anticorpos modificados podem ser preparados utilizando anticorpo anti-CD40 que codifica as moléculas de

ácido nucleico. Por exemplo, "corpos Capa" (Ill et al., Protein Eng. 10: 949-57 (1997)), "Minicorpos" (Martin et al., EMBO J. 13: 5303-9 (1994)), "Diacorpos" (Bolliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)), ou "Janusinas" (Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655-3659 (1991) e Traunecker et al., Int. J. Cancer (Supl) 7: 51-52 (1992)) podem ser preparados usando técnicas de biologia molecular padrão seguindo os ensinamentos da memória descritiva.

Os anticorpos biespecíficos ou fragmentos de ligação a antígeno podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo a fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Veja-se, por exemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al., J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992). Além disso, os anticorpos biespecíficos podem ser formados como "diacorpos" ou "Janusinas". Em algumas formas de realização, o anticorpo biespecífico liga-se a dois epítomos diferentes de CD40. Em algumas formas de realização, o anticorpo biespecífico tem uma primeira cadeia pesada e uma primeira cadeia leve do anticorpo monoclonal 3.1.1, 3.1.1H-A78T, 3.1.1H-A78T-V88A-V97A, 3.1.1L-L4M-L83V, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.28.1L-C92A, 23.29.1, 23.29.1L-R174K e 24.2.1, e uma cadeia de anticorpo pesada e cadeia leve adicional. Em algumas formas de realização, a cadeia leve e cadeia pesada adicionais também são de um dos anticorpos monoclonais identificados acima, mas são diferentes das primeiras cadeias pesadas e leves.

Em alguns exemplos os anticorpos modificados descritos acima são preparados usando um ou mais dos domínios variáveis ou regiões CDR de um anticorpo monoclonal anti-CD40 humano proporcionado no presente documento, de uma sequência de aminoácidos do dito anticorpo monoclonal, ou de uma cadeia pesada ou cadeia leve codificada por uma

sequência de ácido nucleico que codifica o dito anticorpo monoclonal.

Anticorpos Derivatizados e Marcados

Um anticorpo anti-CD40 ou porção de ligação a antígeno da invenção pode ser derivatizado ou vinculado à outra molécula (por exemplo, um outro péptido ou proteína). Em geral, os anticorpos ou porção dos mesmos são derivatizados tais que a ligação a CD40 não é afectada adversamente pela derivatização ou etiquetagem. Consequentemente, os anticorpos e porções de anticorpo da invenção destinam-se a incluir as formas tanto intactas quanto modificadas dos anticorpos anti-CD40 humanos descritos no presente documento. Por exemplo, um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser funcionalmente ligado (pelo acoplamento químico, fusão genética, associação não covalente ou de outra maneira) a uma ou mais outras entidades moleculares, tais como um outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacorpo), um agente de detecção, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou péptido que pode mediar a associação do anticorpo ou porção de anticorpo com outra molécula (tal como uma região de núcleo de estreptavidina ou cauda de polihistidina).

Um tipo de anticorpo derivatizado é produzido pela reticulação de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por exemplo, para criar anticorpos biespecíficos). Os reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncionais, tendo dois grupos distintamente reactivos separados por um espaçador adequado (por exemplo, éster maleimidobenzóil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncionais (por exemplo, suberato de dissuccinimidilo). Tais ligantes estão disponíveis da Pierce Chemical Company, Rockford, II.

Outro tipo de anticorpo derivatizado é um anticorpo etiquetado. Os agentes de detecção úteis com os quais um

anticorpo ou porção de ligação a antígeno da invenção pode ser derivado incluem compostos fluorescentes, incluindo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloreto de 5-dimetilamina-1-naftalenossulfonilo, ficoeritrina, lantanídeos fósforos, e similares. Um anticorpo também pode ser etiquetado com enzimas que são úteis para a detecção, tais como peroxidase de raiz forte, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase, e similares. Quando um anticorpo for etiquetado com uma enzima detectável, é detectado mediante a adição de reagentes adicionais que a enzima usa para produzir um produto de reacção que pode ser diferenciado. Por exemplo, quando o agente peroxidase de rábano picante estiver presente, a adição de peróxido de hidrogénio e diaminobenzidina leva a um produto de reacção colorido, que é detectável. Um anticorpo também pode ser etiquetado com biotina, e detectado através da medição indirecta da ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo também pode ser etiquetado com um epítipo de polipéptido predeterminado por um repórter secundário (por exemplo, sequências de par de zipper de leucina, locais de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epítipo). Em alguns exemplos descritos no presente documento, as etiquetas são ligadas por subdivisões de espaçador de vários comprimentos para reduzir impedimento estérico potencial.

Um anticorpo anti-CD40 pode também ser marcado com um aminoácido radiomarcado. O radiomarcador pode ser usado para ambos propósitos de diagnóstico e terapêuticos. Por exemplo, o radiomarcador pode ser usado para detectar tumores que expressam CD40 por meio de raios X ou outras técnicas de diagnóstico. Além disso, o radiomarcador pode ser usado terapêuticamente como uma toxina para células cancerosas ou tumores. Exemplos de marcadores para polipéptidos incluem, mas não são limitados a, os seguintes

radioisótopos ou radionuclídeos - ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Um anticorpo anti-CD40 também pode ser derivatizado com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo metilo ou etilo, ou um grupo de hidrato de carbono. Estes grupos são úteis para melhorar as características biológicas do anticorpo, por exemplo, para aumentar a semivida no soro ou para aumentar a ligação a tecido.

Composições Farmacêuticas e Kits

A invenção também se refere a composições que compreendem um agonista de anticorpo anti-CD40 humano para utilização no tratamento de indivíduos em necessidade de imunestimulação. Tais composições são úteis para tratar, prevenir, reduzir a frequência ou gravidade da infecção, incluindo infecção viral e bacteriana, para tratar um distúrbio hiperproliferativo, incluindo condições cancerosas e pré-cancerosas, para tratar condições de imunodeficiência genética, tais como síndrome de hiper-IgM e para tratar condições de imunodeficiência primária ou combinada, incluindo condições caracterizadas por neutropenia, num mamífero, incluindo seres humanos. Indivíduos para tratamento com terapêutica de anticorpo agonista anti-CD40 incluem qualquer indivíduo em necessidade de aumento imune, incluindo, mas não limitado a os ancianos e indivíduos que são imunodeprimidos, por exemplo, devido a quimioterapia.

Distúrbios hiperproliferativos que podem ser tratados por um anticorpo agonista anti-CD40 da invenção podem envolver qualquer tecido ou órgão e incluem, mas não são limitados a cânceres do cérebro, pulmão, célula escamosa, bexiga, gástrico, pancreático, mama, cabeça, pescoço, fígado, renal, dos ovários, próstata, colo-rectal, esofágico, ginecológico, nasofaringe, ou tireoide, melanomas, linfomas, leucemias ou mielomas múltiplos. Em particular, anticorpos agonistas anti-CD40 humanos da

invenção são úteis para tratar carcinomas da mama, próstata, cólon e pulmão.

O tratamento pode envolver a administração de um ou mais anticorpos monoclonais agonistas anti-CD40 da invenção, ou fragmentos de ligação a antigénio dos mesmos, em separado ou com um veículo farmacêuticamente aceitável. Como é utilizado no presente documento "veículo farmacêuticamente aceitável" significa qualquer um e todos os solventes, meio de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes de retardo isotónicos e de absorção, e similares que são fisiologicamente compatíveis. Alguns exemplos de veículos farmacêuticamente aceitáveis são água, salina, salina tamponada de fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, assim como suas combinações. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotónicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol ou cloreto de sódio na composição. Exemplos adicionais de substâncias farmacêuticamente aceitáveis são agentes molhantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, que reforçam a validade ou eficácia do anticorpo.

Anticorpos agonistas anti-CD40 da invenção e composições que compreendem os mesmos, podem ser administrados em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos, de diagnóstico ou profilácticos. Agentes terapêuticos adicionais incluem outros agentes anti-neoplásicos, anti-tumorais, anti-angiogénicos ou quimioterápicos. Tais agentes adicionais podem ser incluídos na mesma composição ou administrados separadamente. Como descrito no presente documento um ou mais anticorpos agonistas anti-CD40 da invenção podem ser usados como uma vacina ou como adjuvantes a uma vacina.

As composições desta invenção podem estar numa

variedade de formas, por exemplo, formas de dosagem líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injectáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo planejado de administração e aplicação terapêutica. As composições preferidas típicas estão na forma de soluções injectáveis ou infusíveis, tais como composições semelhantes às utilizadas para a imunização passiva dos seres humanos. O modo preferido de administração é parentérico (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). O anticorpo é administrado por infusão intravenosa ou injeção. Também preferido é que o anticorpo seja administrado por injeção intramuscular ou subcutânea.

As composições terapêuticas tipicamente precisam ser estéreis e estáveis sob as condições de fabrico e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada à alta concentração de fármaco. As soluções estéreis injectáveis podem ser preparadas mediante a incorporação do anticorpo anti-CD40 na quantidade requerida num solvente adequado com uma ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, se requerido, seguidos pela esterilização filtrada. Geralmente, as dispersões são preparadas pela incorporação do composto activo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básica e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação das soluções injectáveis estéreis, os métodos preferidos de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento que produz um pó do ingrediente activo acrescido de qualquer ingrediente desejado de uma solução anteriormente filtrada estéril deste. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, mediante a utilização de um

revestimento tal como a lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pela utilização de tensioactivos. A absorção prolongada de composições injectáveis pode ser realizada mediante a inclusão na composição de um agente que atrasa a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via/modo preferida de administração é subcutânea, intramuscular ou infusão intravenosa. Como será observado pelo artífice versado, a via e/ou modo de administração irá variar dependendo dos resultados desejados.

Como descrito no presente documento, nas composições de anticorpo o composto activo pode ser preparado com um veículo que protegerá o anticorpo contra a liberação rápida, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Os polímeros biocompatíveis biodegradáveis podem ser utilizados, tais como acetato de etileno vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres, e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos aos peritos na especialidade. Veja-se, por exemplo, *Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems* (J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978).

Como descrito no presente documento, um anticorpo anti-CD40 da invenção pode ser administrado oralmente, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se for desejado) pode também ser incluído numa cápsula de carcaça de gelatina dura ou macia, comprimido em comprimidos, ou incorporado directamente na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os anticorpos anti-CD40

podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, wafers, e similares. Para administrar um composto da invenção por outra que não a administração parentérica, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com, um material para prevenir a sua inactivação.

Os compostos activos adicionais também podem ser incorporados nas composições. Em certas formas de realização, um anticorpo anti-CD40 da invenção é co-formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Estes agentes incluem, anticorpos que se ligam a outros alvos (por exemplo, anticorpos que se ligam a um ou mais factores de crescimento ou citocinas ou os seus receptores de superfície celular, tais como anticorpo anti-CTL4), agentes antineoplásicos, agentes anti-tumorais, agentes quimioterápicos, análogos de péptido que activam CD40, CD40L solúvel, um ou mais agentes químicos que activa CD40, e/ou outros agentes conhecidos na especialidade que podem potenciar uma resposta imune contra células tumorais, por exemplo, IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IFN- γ , e GM-CSF. Tais terapêuticas de combinação podem requerer dosagens menores do anticorpo anti-CD40 bem como os agentes co-administrados, assim evitando possíveis toxicidades ou complicações associadas às várias monoterapêuticas.

Os anticorpos agonistas anti-CD40 da invenção e composições que compreendem os mesmos podem também ser administrados em combinação com outros regimes terapêuticos, em particular em combinação com tratamento com radiação.

As composições da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilacticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno da invenção. Uma "quantidade

terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para conseguir o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com factores tais como o estado da doença, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapêuticamente eficaz é também aquela em que quaisquer efeitos tóxicos ou prejudiciais do anticorpo ou porção de anticorpo são anulados pelos efeitos terapêuticamente benéficos. Uma "quantidade profilacticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para alcançar o resultado profilático desejado. Tipicamente, visto que uma dose profiláctica é utilizada em indivíduos antes de ou num estágio mais precoce da doença, a quantidade profilacticamente eficaz será menos do que a quantidade terapêuticamente eficaz.

Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a melhor resposta desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profiláctica). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada conforme indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular as composições parentéricas na forma unitária de dosagem para a facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma farmacêutica unitária como é utilizado no presente documento refere-se às unidades fisicamente discretas, adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto activo calculado para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico requerido. A especificação para as

formas farmacêuticas unitárias da invenção é ditada pelas e directamente dependente das características únicas do anticorpo anti-CD40 ou porção e do efeito terapêutico ou profiláctico particular a ser alcançado, e (b) as limitações inerentes na técnica de compor um tal anticorpo para o tratamento de sensibilidade nos indivíduos.

Um intervalo exemplar, não limitativo para uma quantidade terapêuticamente ou profilacticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é de 0,025 a 50 mg/kg, mais preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg, mais preferentemente de 0,1-25, de 0,1 a 10 ou de 0,1 a 3 mg/kg. É para ser indicado que os valores de dosagem podem variar com o tipo e gravidade da condição a ser aliviada. Deve ser ainda compreendido que para qualquer indivíduo particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados ao longo do tempo de acordo com a necessidade individual e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições, e que os intervalos de dosagem apresentados no presente documento são exemplares apenas.

Também se descrevem no presente documento kits que compreendem um anticorpo anti-CD40 ou porção de anticorpo da invenção ou uma composição que compreende tal anticorpo. Um kit pode incluir, além do anticorpo ou composição, agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Um kit pode incluir, além do anticorpo ou composição, agentes de diagnóstico ou terapêuticos. Um kit pode também incluir instruções para utilização num método de diagnóstico ou terapêutico. Em particular, o kit pode incluir o anticorpo ou uma composição que compreende-o e um agente de diagnóstico que pode ser usado num método descrito a seguir. Como descrito no presente documento, o kit pode incluir também o anticorpo ou uma composição que o compreende e um ou mais agentes terapêuticos que podem ser usados num método descrito a seguir.

Também se descreve no presente documento a utilização das composições para inibir crescimento celular anormal num mamífero a composição compreende uma quantidade de um anticorpo da invenção em combinação com uma quantidade de um agente quimioterápico, em que as quantidades do composto, sal, solvato, ou pró-fármaco, e do agente quimioterápico são juntas eficazes na inibição de crescimento celular anormal. Muitos agentes quimioterápicos são conhecidos actualmente na especialidade. Em algumas formas de realização, o agente quimioterápico é seleccionado a partir do grupo que consiste em inibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inibidores de factor de crescimento, inibidores de ciclo celular, enzimas, inibidores de topoisomerase, modificadores de resposta biológica, anti-hormonas, por exemplo, anti-androgénios, e agentes anti-angiogénese.

Agentes anti-angiogénicos, tais como inibidores de MMP-2 (metaloproteinase de matriz 2), inibidores de MMP-9 (metaloproteinase de matriz 9), e inibidores de COX-II (ciclooxygenase II), podem ser usados em conjunto com um anticorpo anti-CD40 da invenção. Exemplos de inibidores de COX-II úteis incluem CELEBREX™ (alecoxib), valdecoxib, e rofecoxib. Exemplos de inibidores de metaloproteinase de matriz úteis são descritos no documento WO 96/33172 (publicado em 24 de Outubro de 1996), documento WO 96/27583 (publicado em 7 de Março de 1996), Pedido de Patente Europeia N° 97304971.1 (depositado em 8 de Julho de 1997), Pedido de Patente Europeia N° 99308617.2 (depositado em 29 de Outubro de 1999), documento WO 98/07697 (publicado em 26 de Fevereiro de 1998), documento WO 98/03516 (publicado em 29 de Janeiro de 1998), documento WO 98/34918 (publicado em 13 de Agosto de 1998), documento WO 98/34915 (publicado em 13 de Agosto de 1998), documento WO 98/33768 (publicado em 6 de Agosto de 1998), documento WO 98/30566 (publicado em

16 de Julho de 1998), Publicação de Patente Europeia 606.046 (publicada em 13 de Julho de 1994), Publicação de Patente Europeia 931.788 (publicada em 28 de Julho de 1999), documento WO 90/05719 (publicado em 31 de Maio de 1990), documento WO 99/52910 (publicado em 21 de Outubro de 1999), documento WO 99/52889 (publicado em 21 de Outubro de 1999), documento WO 99/29667 (publicado em 17 de Junho de 1999), Pedido Internacional PCT N° PCT/IB98/01113 (depositado em 21 de Julho de 1998), Pedido de Patente Europeia N° 99302232.1 (depositado em 25 de Março de 1999), Pedido de patente da Grã-Bretanha número 9912961.1 (depositado em 3 de Junho de 1999), Pedido provisório US N° 601148.464 (depositado em 12 de Agosto de 1999), Patente US 5.863.949 (expedida em 26 de Janeiro de 1999), Patente US 5.861.510 (expedida em 19 de Janeiro de 1999), e Publicação de Patente Europeia 780.386 (publicada em 25 de Junho de 1997). Em alguns exemplos, os inibidores de MMP são aqueles que não demonstram artralgia. Em alguns exemplos inibidores de MMP inibem selectivamente MMP-2 e/ou MMP-9 em relação às outras metaloproteinases de matriz (isto é, MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, e MMP-13). Alguns exemplos específicos de inibidores de MMP úteis na presente invenção são AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, e os compostos indicados na seguinte lista: ácido 3-[[4- (4-fluoro-fenoxi)- benzenosulfonil]- (1-hidroxycarbamoil-ciclopentil)-amino]-propiónico; hidroxiamida do ácido 3-exo-3- [4-(4-fluoro-fenoxi)-benzenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo [3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida do ácido (2R, 3R) 1- [4-(2-cloro-4-fluoro-benziloxi)-benzenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidina-2-carboxílico; hidroxiamida do ácido 4- [4-(4-fluoro-fenoxi)-benzenosulfonilamino]-tetrahydro-piran-4-carboxílico; ácido 3- [[4-(4-fluoro-fenoxi)-benzenosulfonil]- (1-hidroxycarbamoil-ciclobutil)-amino]-propiónico; hidroxiamida do ácido 4- [4-(4-cloro-fenoxi)-

benzenosulfonilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico;
 hidroxiamida do ácido (R) 3- [4-(4-cloro-fenoxi)-
 benzenosulfonilamino]-tetrahidropiran-3-carboxílico;
 hidroxiamida do ácido (2R, 3R) 1- [4-(4-fluoro-2-metil-
 benziloxi)-benzenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidina-2-
 carboxílico; ácido 3- [[4-(4-fluoro-fenoxi)-
 benzenosulfonil]-(1-hidroxycarbamoil-1-metil-etil)-amino]-
 propiônico; ácido 3- [[4-(4-fluoro-fenoxi)-
 benzenosulfonil]-(4-hidroxycarbamoil-tetrahidro-piran-4-
 il)-amino]-propiônico; hidroxiamida do ácido 3-exo-3- [4-
 (4-cloro-fenoxi)-benzenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo
 [3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida do ácido 3-endo-
 3- [4-(4-fluoro-fenoxi)-benzenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo
 [3.2.1]octano-3-carboxílico; e hidroxiamida do ácido (R) 3-
 [4-(4-fluoro-fenoxi)-benzenosulfonilamino]-
 tetrahidrofurano-3-carboxílico; e sais farmacêuticamente
 aceitáveis e solvatos dos ditos compostos.

Um composto da invenção pode também ser usado com
 inibidores de transdução de sinal, tais como agentes que
 podem inibir respostas de EGF-R (receptor de factor de
 crescimento epidérmico), tais como anticorpos de EGF-R,
 anticorpos de EGF, e moléculas que são inibidores de EGF-R;
 inibidores de VEGF (factor de crescimento endotelial
 vascular), tais como receptores de VEGF e moléculas que
 podem inibir VEGF; e inibidores de receptor de erbB2, tais
 como moléculas orgânicas ou anticorpos que se ligam ao
 receptor etbB2, por exemplo, HERCEPTINTM (Genentech, Inc).
 inibidores de EGF-R são descritos em, por exemplo, no
 documento WO 95/19970 (publicado em 27 de Julho de 1995),
 documento WO 98/14451 (publicado em 9 de Abril de 1998),
 documento WO 98/02434 (publicado em 22 de Janeiro de 1998),
 e Patente US 5.747.498 (expedida em 5 de Maio de 1998), e
 tais substâncias podem ser usadas como descrito no presente
 documento. Agentes de inibição de EGFR incluem, mas não são
 limitados a, os anticorpos monoclonais C225 e anti-EGFR

22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. e Merck KgaA), e os compostos ZD-1834, ZD-1838 e ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183,805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387,785 (Wyet-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLN-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusão de EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Scragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes-Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GN-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) e Vacina de EGF-R (York Medical/Centro de Immunologia Molecular (CIM)). Estes e outros agentes de inibição de EGF-R podem ser usados como descrito no presente documento.

Os inibidores de VEGF, por exemplo, SU-5416 e SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering), e NX-1838 (NeXstar) podem também ser combinados com o composto da presente invenção. Os inibidores de VEGF são descritos em, por exemplo, no documento WO 99/24440 (publicado em 20 de Maio de 1999), Pedido Internacional PCT PCT/IB99/00797 (depositado em 3 de Maio 3 de 1999), no documento WO 95/21613 (publicado em 17 de Agosto de 1995), documento WO 99/61422 (publicado em 2 de Dezembro de 1999), Patente US 5.834.504 (expedida em 10 de Novembro de 1998), documento WO 98/50356 (publicado em 12 de Novembro de 1998), Patente US 5.883.113 (expedida em 16 de Março de 1999), Patente US 5.886.020 (expedida em 23 de Março de 1999), Patente US 5.792.783 (expedida em 11 de Agosto de 1998), documento WO 99/10349 (publicado em 4 de Março de 1999), documento WO 97/32856 (publicado em Setembro 12, 1997), documento WO 97/22596 (publicado em 26

de Junho de 1997), documento WO 98/54093 (publicado em 3 de Dezembro de 1998), documento WO 98/02438 (publicado em 22 de Janeiro de 1998), documento WO 99/16755 (publicado em 8 de Abril de 1999), e documento WO 98/02437 (publicado em 22 de Janeiro de 1998). Outros exemplos de alguns inibidores de VEGF específicos úteis sob este aspecto se descrevem no presente documento IM862 (Cytran Inc).; anticorpo monoclonal anti-VEGF de Genen-tech, Inc.; e angiozyme, uma ribozima sintética de Ribozyme e Chiron. Estes e outros inibidores de VEGF podem ser usados como descrito no presente documento. Inibidores de receptor de ErbB2, tais como GN-282974 (Glaxo Wellcome plc), e os anticorpos monoclonais AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc). e 2B-1 (Chiron), podem ser, além disso, combinados com o composto da invenção, por exemplo, aqueles indicados no documento WO 98/02434 (publicado em 22 de Janeiro de 1998), documento WO 99/35146 (publicado em 15 de Julho de 1999), documento WO 99/35132 (publicado em 15 de Julho de 1999), documento WO 98/02437 (publicado em 22 de Janeiro de 1998), documento WO 97/13760 (publicado em 17 de Abril de 1997), documento WO 95/19970 (publicado em 27 de Julho de 1995), Patente US 5.587.458 (expedida em 24 de Dezembro de 1996), e Patente US 5.877.305 (expedida em 2 de Março de 1999). Inibidores de receptor de ErbB2 úteis sob os aspectos descritos no presente documento são também descritos no Pedido Provisório US N° 60/117.341, depositado em 27 de Janeiro de 1999, e no Pedido Provisório US N° 60/117.346, depositado em 27 de Janeiro de 1999. Os compostos inibidores de receptor de erbB2 e substâncias descritas nos Pedidos PCT, Patentes US N°, e Pedidos provisórios US mencionados acima, bem como outros compostos e substâncias que inibem o receptor de erbB2, podem ser usados com o composto da presente invenção como descrito no presente documento.

Os agentes anti-sobrevivência incluem anticorpos anti-IGF-IR e agentes anti-integrina, tais como anticorpos anti-

integrina.

Métodos Diagnósticos de Utilização

Também se descrevem no presente documento métodos de diagnóstico. Os anticorpos anti-CD40 podem ser usados para detectar CD40 numa amostra biológica *in vitro* ou *in vivo*. Descreve-se especificamente um método para diagnosticar a presença ou localização de um tumor que expressa CD40 num indivíduo em necessidade do mesmo, que compreende as etapas de injectar o anticorpo no indivíduo, determinar a expressão de CD40 no indivíduo por meio da localização de onde o anticorpo foi ligado, comparar a expressão no indivíduo com essa de um indivíduo de referência normal ou padrão, e diagnosticar a presença ou localização do tumor.

Os anticorpos anti-CD40 podem ser usados num imunoensaio convencional, incluindo, sem limitação, um ELISA, um RIA, FACS, imunohistoquímica do tecido, Western Blot ou imunoprecipitação. Os anticorpos anti-CD40 da invenção podem ser usados para detectar CD40 de seres humanos. Em outra forma de realização, os anticorpos anti-CD40 podem ser usados para detectar CD40 de primatas do Velho Mundo tais como macacos cinomolgos e rhesus, chimpanzés e símios. Também se descreve no presente documento um método para detecção de CD40 numa amostra biológica que compreende o contacto da amostra biológica com um anticorpo anti-CD40 da invenção e detecção do anticorpo ligado. Como descrito o anticorpo anti-CD40 pode ser directamente marcado com um marcador detectável. Como descrito ainda, o anticorpo anti-CD40 (o primeiro anticorpo) pode não ser marcado e um segundo anticorpo ou outra molécula que pode se ligar ao anticorpo anti-CD40 é marcado; Como é bem conhecido a um perito na especialidade, um segundo anticorpo é escolhido que é capaz de ligar-se especificamente às espécies e classe particulares do primeiro anticorpo. Por exemplo, se o anticorpo anti-CD40 for uma IgG humano, então o anticorpo secundário pode ser

uma IgG anti-humano. Outras moléculas que podem se ligar aos anticorpos incluem Proteína A e Proteína G, ambas das quais são disponíveis comercialmente, por exemplo, da Pierce Chemical Co.

Marcadores adequados para o anticorpo ou anticorpo secundário foram revelados anteriormente, e incluem várias enzimas, grupos protéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes e materiais radioactivos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano picante, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinaesterase; exemplos de complexos de grupo protético adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; e exemplos de material radioactivo adequado incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Como também descrito no presente documento, o CD40 pode ser analisado numa amostra biológica por um imunoensaio de concorrência utilizando padrões de CD40 marcados com uma substância detectável e um anticorpo anti-CD40 não marcado. Neste ensaio, a amostra biológica, os padrões de CD40 marcados e o anticorpo anti-CD40 são combinados e a quantidade de padrão de CD40 marcado ligada ao anticorpo não marcado é determinada. A quantidade de CD40 na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de padrão de CD40 marcado ligado ao anticorpo anti-CD40.

Pode-se usar os imunoensaios divulgados acima para vários propósitos. Por exemplo, os anticorpos anti-CD40 podem ser utilizados para detectar CD40 nas células cultivadas. Especificamente os anticorpos anti-CD40 podem ser usados para determinar a quantidade de CD40 na

superfície de células que foram tratadas com vários compostos. Este método pode ser utilizado para identificar compostos que modulam os níveis de proteína CD40. De acordo com este método, uma amostra de células é tratada com um composto de teste por um período de tempo enquanto uma outra amostra é deixada sem tratamento. Se o nível total de CD40 tiver que ser medido, as células são submetidas a lise e o nível de CD40 total é medido através de um dos imunoensaaios descritos acima. O nível total de CD40 nas células tratadas versus não tratadas é comparado para determinar o efeito do composto de teste.

Um imunoensaio bem adequado para medir níveis de CD40 total é um ELISA ou Western blot. Se o nível de superfície celular de CD40 tiver que ser medido, as células não são lisadas e os níveis de superfície celular de CD40 são medidos através de um dos imunoensaaios descritos acima. Outro imunoensaio para determinar níveis de superfície celular de CD40 inclui as etapas de marcação das proteínas de superfície celular com um marcador detectável, tal como biotina ou ^{125}I , imunoprecipitar o CD40 com um anticorpo anti-CD40 e então detectar o CD40 marcado. Outro imunoensaio para determinar a localização de CD40, por exemplo, níveis de superfície celular, é usar imunohistoquímica. Os métodos tais como ELISA, RIA, Western Blot, imunohistoquímica, marcação da superfície celular das proteínas de membrana integrais e imunoprecipitação são bem conhecidos na técnica. Veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, supra. Além disso, os imunoensaaios podem ser graduados para cima para o rastreio de produção elevada de modo a testar um grande número de compostos para activação ou inibição da expressão de CD40.

Os anticorpos anti-CD40 da invenção também podem ser usados para determinar os níveis de CD40 num tecido ou em células derivadas do tecido. Em algumas formas de realização, o tecido é um tecido doente. Como descrito no

presente documento, o tecido pode ser tumor ou uma biópsia do mesmo. Em algumas variações do método, um tecido ou uma biópsia deste é extirpado de um paciente. O tecido ou biópsia é depois usado num imunoensaio para determinar, por exemplo, os níveis de CD40 totais, níveis de superfície celular de CD40 ou localização de CD40 pelos métodos debatidos acima.

O método de diagnóstico descrito acima pode ser usado para determinar se um tumor expressa níveis altos de CD40, que poderia ser indicativo de que o tumor é um alvo para tratamento com anticorpo anti-CD40. Além disso, o mesmo método pode também ser usado para monitorizar o efeito do tratamento com anticorpo anti-CD40 por meio da detecção de morte celular no tumor. O método de diagnóstico pode também ser usado para determinar se um tecido ou célula expressa níveis insuficientes de CD40 ou CD40 activado, e assim é um candidato para tratamento com anticorpos anti-CD40 de activação, CD40L e/ou outros agentes terapêuticos para aumentar níveis ou actividade de CD40.

Os anticorpos da presente invenção podem também ser usados *in vivo* para identificar tecidos e órgãos que expressam CD40. Em algumas formas de realização, os anticorpos anti-CD40 são usados para identificar tumores que expressam CD40. Uma vantagem de utilização dos anticorpos anti-CD40 humanos da presente invenção é que podem ser usados de maneira segura *in vivo* sem provocar uma resposta imune ao anticorpo após a administração, diferente de anticorpos de origem não humana ou com anticorpos humanizados.

O método compreende as etapas de administrar um anticorpo anti-CD40 marcado de maneira detectável ou uma composição que compreende os mesmos a um paciente em necessidade de tal teste de diagnóstico e submeter o paciente a análise de imageamento para determinar a localização dos tecidos que expressam CD40. A análise de

imageamento é bem conhecida na especialidade médica, e inclui, sem limitação, análise por raios X, formação de imagem por ressonância magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (CE). O anticorpo pode ser marcado com qualquer agente adequado para formação de imagem *in vivo*, por exemplo, um agente de contraste, tal como bário, que pode ser usado para análise por raios X, ou um agente de contraste magnético, tal como um quelato de gadolínio, que pode ser usado para MRI ou CE. Outros agentes marcadores incluem, sem limitação, radioisótopos, tais como ^{99}Tc . Como descrito no presente documento, o anticorpo anti-CD40 não será marcado e será digitalizado pela administração de um segundo anticorpo ou outra molécula que seja detectável e que possa se ligar ao anticorpo anti-CD40. Numa variação, uma biópsia é obtida do paciente para determinar se o tecido de interesse expressa CD40.

Métodos Terapêuticos de Utilização

Em outro aspecto a invenção proporciona um anticorpo anti-CD40 da invenção para utilização em terapêutica.

Um anticorpo agonista anti-CD40 humano da invenção pode ser administrado a um ser humano ou a um mamífero não humano que expressa um CD40 de reacção cruzada. O anticorpo pode ser administrado a tal mamífero não humano (isto é, um primata, macaco cinomolgos ou rhesus) para propósitos veterinários ou como um modelo animal de doença humana. Tais modelos animais são úteis para a avaliação da eficácia terapêutica de anticorpos desta invenção.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado a um indivíduo que sofre de imunodeficiências primárias e/ou combinadas, incluindo imunodeficiência dependente de CD40 com Síndrome de hiper-IgM, Imunodeficiência Variável Comum. Agamaglobulinemia de Bruton, deficiências de subclasse IgG, e SCID ligado a X (mutações de cadeia gama comuns). Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado para

tratar um indivíduo que é imunodeprimido, por exemplo, devido a quimioterapia, ou tem uma doença que debilita o sistema imune, incluindo qualquer doença de deficiência imune adquirida, tal como VIH. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado para aumentar a imunidade de um indivíduo de idade avançada. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado para tratar um indivíduo que tem uma infecção bacteriana, viral, fúngica ou parasítica. Em algumas formas de realização, um anticorpo agonista anti-CD40 humano da invenção pode ser administrado profilacticamente a um indivíduo que, por causa de idade, enfermidade ou pobre saúde geral é susceptível a infecção para prevenir ou para reduzir o número ou gravidade de infecções.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado a um indivíduo que tem um distúrbio hiperproliferativo.

Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado para tratar um indivíduo que tem um tumor. Em algumas formas de realização, o tumor é CD40 positivo. Em algumas formas de realização, o tumor é um CD40 negativo. O tumor pode ser um tumor sólido ou um tumor não sólido tal como linfoma. Em algumas formas de realização, um anticorpo anti-CD40 é administrado a um paciente que tem um tumor que é canceroso. Em algumas formas de realização, o anticorpo inibe proliferação de células de cancro, inibe ou previne um aumento em peso ou volume de tumor, e/ou causa uma diminuição em peso ou volume de tumor.

Os pacientes que podem ser tratados com anticorpos anti-CD40 ou porções de anticorpo da invenção incluem pacientes que foram diagnosticados como tendo cancro cerebral, cancro de pulmão, cancro ósseo, cancro pancreático, cancro de pele, cancro da cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intraocular, cancro uterino, cancro dos ovários, cancro rectal, cancro da região anal, cancro do

estômago, cancro gástrico, cancro colo-rectal, cancro do cólon, cancro da mama, tumores ginecológicos (por exemplo, sarcomas uterinos, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina ou carcinoma da vulva), cancro do esófago, cancro do intestino delgado, cancro do sistema endócrino (por exemplo, cancro da tireoide, paratireoide ou glândulas adrenais), sarcomas de tecidos moles, leucemia, mieloma, mieloma múltiplo, cancro da uretra, cancro do pênis, cancro da próstata, leucemia crónica ou aguda, tumores sólidos da infância, doença de Hodgkin, linfomas linfocíticos, linfoma não Hodgkin, cancro da bexiga, cancro do fígado, cancro renal, cancro do rim ou ureter (por exemplo, carcinoma de célula renal, carcinoma da pélvis renal), ou neoplasmas do sistema nervoso central (por exemplo, linfoma do CNS primário, tumores do eixo espinhal, gliomas estaminais do cérebro ou adenomas da pituitária), glioma ou fibrossarcoma.

O anticorpo pode ser administrado de três vezes ao dia a uma vez a cada seis meses, e preferentemente pode ser administrado por meio de uma via oral, da mucosa, bucal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, intramuscular, parenteral, intratumoral, transdérmica ou tópica. O anticorpo também pode ser administrado continuamente através de uma minibomba. O anticorpo será geralmente administrado enquanto o tumor estiver presente com a condição de que o anticorpo faça com que o tumor ou cancro pare de crescer ou diminua em peso ou volume. A dosagem de anticorpo será geralmente no intervalo de 0,025 a 50 mg/kg, mais preferentemente de 0,1 a 50 mg/kg, mais preferentemente 0,1-20 mg/kg, 0,1-10 mg/kg, 0,1-5 mg/kg ou ainda mais preferível 0,1-2 mg/kg. O anticorpo pode também ser administrado profilacticamente.

Como descrito no presente documento o anticorpo anti-CD40 é administrado como parte de um regime terapêutico que

inclui um ou mais fármacos ou moléculas antineoplásicas adicionais a um paciente que tem um distúrbio hiperproliferativo, tal como cancro ou um tumor. Agentes anti-tumorais exemplares incluem, mas não são limitados a, inibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, agentes intercalantes, inibidores de factor de crescimento, inibidores de ciclo celular, enzimas, inibidores de topoisomerase, modificadores de resposta biológica, anti-hormonas, inibidores de cinase, inibidores de metaloprotease de matriz, terapêuticas genéticas e anti-androgénios. Em mais formas de realização preferidas, o anticorpo anti-CD40 é administrado com um agente antineoplásico, tal como adriamicina ou taxol. Em algumas formas de realização preferidas, a terapêutica anti-CD40 é realizado juntamente com radioterapêutica, quimioterapia, terapêutica fotodinâmica, cirurgia ou outra imunoterapêutica. Em algumas formas de realização, o anticorpo anti-CD40 é administrado com um ou mais anticorpos adicionais. Por exemplo, o anticorpo anti-CD40 pode ser administrado com anticorpos que são conhecidos pela inibição de proliferação de células de tumor ou cancro. Tais anticorpos incluem, mas não são limitados a, um anticorpo que inibe CTLA4, receptor de erbB2, EGF-R, IGF-1R, CD20 ou

Como descrito no presente documento, anticorpo anti-CD40 pode ser marcado com um radiomarcador, uma imunotoxina ou uma toxina, ou é uma proteína de fusão que compreende um péptido tóxico. O anticorpo anti-CD40 ou proteína de fusão de anticorpo anti-CD40 direcciona o radiomarcador, imunotoxina, toxina ou péptido tóxico à célula de cancro ou tumor. Numa forma de realização preferida, o radiomarcador, imunotoxina, toxina ou péptido tóxico é internalizado pela célula de cancro ou tumor após o anticorpo anti-CD40 se ligar ao CD40 na superfície da célula.

Em outro aspecto, o anticorpo anti-CD40 pode ser usado

terapeuticamente para induzir a apoptose de células específicas num paciente. Em muitos casos, as células direccionadas para apoptose são células cancerosas ou tumorais. Assim, a invenção proporciona um método de indução de apoptose por meio da administração de um anticorpo anti-CD40 a um paciente em necessidade do mesmo.

Em outro aspecto, um método de administrar um anticorpo de activação anti-CD40 a um paciente para aumentar a actividade de CD40 é descrito no presente documento. Um anticorpo anti-CD40 é administrado com um ou mais outros factores que aumentam a actividade de CD40. Tais factores incluem CD40L, e/ou análogos de CD40L que activam CD40.

O anticorpo anti-CD40 pode ser também ser administrado com um ou mais agentes potenciadores do sistema imune adicionais, incluindo, sem limitação IFN- β 1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, IFN- γ , e GM-CSF.

Um anticorpo agonista anti-CD40 humano da invenção pode também ser usado como um adjuvante para aumentar a eficácia de uma vacina. Quando usado deste modo, o anticorpo anti-CD-40 activa CD40 em células apresentadoras de antígeno, incluindo células B, células dendríticas e monócitos bem como potenciam a produção de moléculas imunomoduladoras, tais como citocinas e quimiocinas. O efeito imunoestimulador do anticorpo aumenta a resposta imune do indivíduo vacinado ao antígeno de vacina.

Em outro aspecto, um método para gerar uma vacina de célula dendrítica para cancro ou para imunoterapêutica de célula dendrítica é descrito no presente documento. De acordo com o método as células dendríticas de um paciente com cancro são cultivadas durante 1-5 dias com lisado ou homogeneizado de tumor, células tumorais destruídas por irradiação ou outros meios, ou antígenos específicos a tumor (por exemplo, péptidos, idiotipos) e 1-10 μ g/ml de um anticorpo anti-CD40. As células dendríticas pulsadas com

antigénio de tumor são re-injectadas no paciente para estimular respostas imunes anti-tumorais, particularmente respostas de CTL anti-tumorais. Células dendríticas derivadas de monócitos para utilização no método podem ser obtidas a partir de uma amostra de sangue periférico por meio da cultura em IL-4 e GM-CSF. Células dendríticas também podem ser derivadas a partir da medula óssea de um paciente por purificação magnética ou classificação de células CD34 positivas, seguido por cultura em IL-4 e GM-CSF.

Terapêutica Genética

As moléculas de ácido nucleico da presente invenção podem ser administradas a um paciente com necessidade através da terapêutica genética. A terapêutica pode ser *in vivo* ou *ex vivo*. Numa forma de realização preferida, as moléculas de ácido nucleico que codificam tanto uma cadeia pesada quanto uma cadeia leve são administradas a um paciente. Também descrito no presente documento, as moléculas de ácido nucleico podem ser administradas tais que elas são estavelmente integradas em cromossomas de células B, porque estas células são especializadas para a produção de anticorpos. Como também descrito no presente documento, as células precursoras B são transfectadas ou infectadas *ex vivo* e re-transplantadas num paciente em necessidade do mesmo. Também descrito no presente documento está que as células precursoras B ou outras células são infectadas *in vivo* usando um vírus conhecido de infectar o tipo de célula de interesse. Os vectores típicos utilizados para a terapêutica genética incluem lipossomas, plasmídeos e vectores virais. Os vectores virais exemplares são retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Após a infecção, quer *in vivo* ou *ex vivo*, os níveis de expressão de anticorpos podem ser monitorizados por tomar uma amostra do paciente tratado e usar qualquer imunoensaio conhecido na técnica ou debatido no presente documento.

Como descrito no presente documento, o método de terapêutica genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antígeno desta de um anticorpo anti-CD40 e que expressa a molécula do ácido nucleico. Também descrito no presente documento está que o método de terapêutica genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia leve ou uma porção de ligação a antígeno desta de um anticorpo anti-CD40 e que expressa a molécula de ácido nucleico. Outro método descrito no presente documento é que o método de terapêutica genética compreende as etapas de administrar uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antígeno desta e uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica a cadeia leve ou o porção de ligação a antígeno desta de um anticorpo anti-CD40 da invenção e que expressa as moléculas de ácido nucleico. O método de terapêutica genética pode também compreender a etapa de administrar outro agente anti-cancro, tal como taxol ou adriamicina.

De modo que esta invenção possa ser melhor compreendida, os seguintes exemplos são apresentados. Estes exemplos são para propósitos de ilustração e não devem ser interpretados como limitativos do âmbito da invenção de qualquer maneira.

EXEMPLO I

Geração de Hibridoma que Produz Anticorpo Anti-CD40

Os anticorpos da invenção foram preparados, seleccionados, e ensaiados como se segue:

Imunização e geração de hibridoma

Foram imunizados XenoMice™ de oito a dez semanas de idade intraperitonealmente ou nas suas patas traseiras com um proteína de fusão de CD40-IgG (10 µg/dose/ratinho) ou com células 300.19-CD40 que é uma linha de células

transfectadas que expressam CD40 humano na sua membrana plasmática (10×10^6 células/dose/ratinho). Repetiu-se esta dose cinco a sete vezes ao longo de um período de três a oito semanas. Quatro dias antes da fusão, deu-se aos ratinhos uma injeção final do domínio extracelular de CD40 humano em PBS. Foram fusionados os linfócitos do baço e nódulo linfático de ratinhos imunizados com a linha de células P3-X63-Ag8.653 de mieloma não segregadoras, e submeteu-se as células fusionadas a selecção de HAT como anteriormente descrito (Galfre e Milstein, *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981). Recuperou-se um painel de hibridomas todos segregando anticorpos IgG2 κ específicos CD40 humano. Foram seleccionados onze hibridomas para estudo adicional e designados como 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1.

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

<u>Hibridoma</u>	<u>Nº de Depósito</u>
3.1.1 (LN 15848)	PTA-3600
7.1.2 (LN 15849)	PTA-3601
10.8.3 (LN 15850)	PTA-3602
15.1.1 (LN 15851)	PTA-3603
21.4.1 (LN 15853)	PTA-3605
21.2.1 (LN 15874)	PTA-4549
22.1.1 (LN 15875)	PTA-4550
23.5.1 (LN 15855)	PTA-4548
23.25.1 (LN 15876)	PTA-4551
23.28.1 (LN 15877)	PTA-4552
23.29.1 (LN 15878)	PTA-4553

EXEMPLO IISequências de Anticorpos Anti-CD40 Preparadas de acordo com a invenção

Para analisar a estrutura de anticorpos produzida *cie* acordo com a invenção, foram clonados ácidos nucleicos que codificam os fragmentos de cadeia pesada e leve dos anticorpos monoclonais anti-CD40 produtores dos hibridomas. A clonagem e a sequenciação foram conseguidas como se segue.

Isolou-se Poli(A)⁺ ARNm de aproximadamente 2 X 10⁵ células de hibridoma derivadas a partir de ratinhos XenoMouse™ imunizados com CD40 humano como descrito no Exemplo I usando um kit Fast-Track (Invitrogen). Seguiu-se a PCR a geração de ADNc iniciado aleatório. Usou-se iniciadores da região variável humano específicos para a família V_H ou V_K humana (Marks *et al.*, "Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes." Eur. J. Immunol. 21:985-991 (1991)) ou um iniciador V_H humano universal, MG-30, CAGGTGCAGCTGGAGCAGTCIGG (SEQ ID NO: 118), em conjunto com iniciadores específicos para a região constante Cj2 humana, MG-40d, 5'-GCTGAGGGAGTAGAGTCCTGAGGA-3' (SEQ ID NO: 119) ou região constante Ck (hκP2; como anteriormente descrito em Green *et al.*, 1994). Obteve-se moléculas de ácido nucleico que codificam transcritos *capa* de cadeia leve e pesada humana dos hibridomas produtores de anti-CD40 por sequenciamento directo de produtos de PCR gerados a partir de ARN de poli(A⁺) usando os iniciadores descritos acima. Também se clonaram produtos de PCR em pCRII usando um kit de clonagem TA (Invitrogen) e sequenciaram ambas cadeias usando kits de sequenciamento de corante terminador Prism e uma máquina de sequenciamento ABI 377. Analisou-se todas as sequências por alinhamentos ao "directório de sequência V

BASE" (Tomlinson *et al.*, MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, UK) usando programas de software MacVector e Geneworks.

Além disso, os anticorpos monoclonais 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.28.1, 23.29.1 e 24.2.1 foram submetidos a clonagem e sequenciamento de ADN de comprimento completo. Para tal sequenciamento, isolou-se ARN de aproximadamente 4×10^6 células de hibridoma usando kit de isolamento QIAGEN RNeasy ARN (QIAGEN). O ARNm foi transcrito reversamente usando oligo-dT(18) e o kit Advantage RT/PCR (Clonetech). Usou-se V Base para projectar iniciadores directos de amplificação que incluíam locais de restrição, sequência óptima Kozak, o local de início ATG e parte da sequência sinal da cadeia pesada. O Quadro 1 lista os iniciadores directos de amplificação usados para sequenciar os clones de anticorpo.

QUADRO 1

Clone	Cadeia pesada de iniciador directo
3.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTT GGGCTGAGCTG-3'(SEQ ID NO: 120)
7.1.2	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAGTTT GGGCTGAGCTG-3'(SEQ ID NO: 121)
10.8.3	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACAC CTGTGGTTCCTCC-3'(SEQ ID NO: 122)
15.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAACAT CTGTGGTTCCTCC 3'(SEQ ID NO: 123)
21.4.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGGACTGG ACCTGGAGGATCC-3'(SEQ ID NO: 124)
21.2.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGA GTTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:128)
22.1.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAG TTTGGGCTGAGCTG-3' (SEQ ID NO:129)
23.5.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAG TTTGGGCTGAGCTG-3'(SEQ ID NO:130)

Clone	Cadeia pesada de iniciador directo
23.28.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAAA CATCTGTGGTTCTTCC-3'(SEQ ID NO:131)
23.29.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGACCGCCACCATGGAG TTTGGGCTGAGCTG-3'(SEQ ID NO:132)
24.2.1	5'-TATCTAAGCTTCTAGACTCGAGCGCCACCATGAA ACATCTGTGGTTCTTCC-3'(SEQ ID NO:133)

Usou-se o mesmo método para projectar um iniciador para incluir as sequências codificantes 3', o codão de parada da região constante de IgG2, (5'-TTCTCTGATCAGAATTCC TATCATTTACCCGGAGACAGGGAGAG-3') (SEQ ID NO:125) e locais de restrição.

Também se usou o mesmo método para projectar um iniciador ao redor do local de início ATG da cadeia capa: (5'-CT-TCAAGCTTACCCGGGCCACCATGAGGCTCC CTGCTCAGC-3') (SEQ ID NO:126). Uma sequência óptima Kozak (CCGCCACC) foi adicionada 5' ao local de início ATG. Este iniciador foi usado para clonar por PCR as cadeias leves dos seguintes clones de anticorpo: 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1 e 23.29.1. Usou-se um segundo iniciador directo 5'-TCTTC AAGCTTGCCCGGGCCCGCCACCATGGAAACCCCGAGCGCAG-3' (SEQ ID NO. 134) para clonar as cadeias leves de clones 23.28.1 e 24.2.1. Também se usou o mesmo método para projectar um iniciador ao redor do codão de parada da região constante capa (5'-TTCTTTGATCAGAATTCTCACTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC-3') (SEQ ID NO: 127). Usou-se os pares de iniciadores para amplificar os ADNc usando o Kit Advantage High Fidelity PCR (Clonetech). Obteve-se a sequência do produto de PCR por sequenciamento directo usando técnicas padrão (por exemplo, *primer walking*) usando kits de sequenciamento de corante terminador e uma máquina de sequenciamento ABI. Clonou-se o produto de PCR num vector de expressão de mamíferos e os clones foram sequenciados para confirmar mutações

somáticas. Para cada clone, verificou-se a sequência em ambas as cadeias em pelo menos três reacções.

Análise de Utilização de Gene

O Quadro 2 apresenta a utilização pelos clones de hibridomas seleccionados dos anticorpos de acordo com a invenção:

QUADRO 2

Utilização do gene de cadeia pesada e leve						
Clone	Cadeia pesada				Cadeia leve capa	
	V _H	D	JH		VK	JK
3.1.1	(3-30+) DP-49	D4+ DIR3	JH6		A3/A19 (DPK-15)	JK1
7.1.2	(3-30+) DP-49	DIR5+ D1-26	JH6		A3/A19 (DPK-15)	JK1
10.8.3	(4,35) VIV-4	DIR3	JH6		L5 (DP5)	JK4
15.1.1	(4-59) DP-71	D4-23	JH4		A3/A19 (DPK-15)	JK2
21.4.1	(1-02) DP-75	DLR1	JH4		L5 (DP5)	JK4
21.2.1	(3-30+) DP-49	DIR3+ D6-19	JH4		A3/A19 (DPK-15)	JK23
22.1.1	(3-30+) DP-49	D1-1	JH6		A3/A19 (DPK-15)	JK1
23.5.1	(3-30+) DP-49	D4-17	JH6		A3/A19 (DPK-15)	JK1
23.28.1	(4-59) DP-71	DIR1+ D4-17	JH5		A27 (DPK-22)	JK3
23.29.1	(3-30,3) DP-46	D4-17	JH6		A3/A19 (DPK-15)	JK1
24.2.1	(4-59) DP-71	DIR1+ D4-17	JH5		A27 (DPK-22)	JK3

Análise de Sequência E Mutação

Como será apreciado, a análise de utilização de gene proporciona somente uma visão geral limitada de estrutura de anticorpo. Como as células B em animais XenoMouse™ geram estocasticamente transcritos capa de cadeia V-D-J pesada ou V-J leve, existe um número de processos secundários que ocorrem, incluindo, sem limitação, hipermutação somática, deleções, N-adicações, e extensões de CDR3. Veja-se, por exemplo, Mendez *et al.*, Nature Genetics 15:146-156 (1997) e Publicação de Patente Internacional WO 98/24893. Consequentemente, para examinar adicionalmente a estrutura de anticorpo, sequências de aminoácidos preditas dos

anticorpos foram geradas a partir dos ADNc obtidos a partir dos clones. O Quadro A proporciona os identificadores de sequência para cada uma das sequências de nucleótido e aminoácidos preditas dos anticorpos sequenciados.

Os Quadros 3-7 proporcionam as sequências de aminoácidos preditas e de nucleótidos das cadeias capa pesada e leve dos anticorpos 3.1.1 (Quadro 3), 7.1.2 (Quadro 4), 10.8.3 (Quadro 5), 15.1.1 (Quadro 6) e 21.4.1 (Quadro 7).

Os Quadros 8-13 proporcionam as sequências de aminoácidos preditas e de nucleótidos do domínio variável da cadeia pesada e cadeia leve capa dos anticorpos 21.2.1 (Quadro 8), 22.1.1 (Quadro 9), 23.5.1 (Quadro 10), 23.28.1 (Quadro 11), 23.29.1 (Quadro 12) e 24.2.1 (Quadro 13).

A sequência de ADN do sequenciamento de comprimento total de anticorpo monoclonal 23.28.1 difere de sequências de ADN obtidas a partir do sequenciamento da região V_H do produto de PCR inicial por um par de base (C a G), resultando numa mudança de resíduo 16 da cadeia pesada natural de D a E.

Os Quadros 14-19 proporcionam as sequências de aminoácidos preditas e de nucleótidos das cadeias capa pesada e leve dos anticorpos 21.2.1 (Quadro 14), 22.1.1 (Quadro 15), 23.5.1 (Quadro 16), 23.28.1 (Quadro 17), 23.29.1 (Quadro 18) e 24.2.1 (Quadro 19). Nos Quadros, a sequência de péptido sinal (ou as bases que codificam as mesmas) estão sublinhadas.

Foram geradas dois anticorpos mutados, 22.1.1 e 23.28.1. A cadeia pesada de anticorpo 22.1.1 foi mutada para alterar um resíduo de cisteína na posição 109 a um resíduo de alanina. Designou-se o clone mutado 22.1.1H-C019A. A cadeia leve de anticorpo 23.28.1 na posição 92 foi mutada também para alterar um resíduo de cisteína a um resíduo de alanina. Designou-se o clone mutado 23.28.1L-C92A.

A mutagénese de resíduos específicos foi levada a cabo por meio do projecto de iniciadores e usando o Kit de Mutagénese Direcctionada a Local QuickChange de Stratagene, de acordo com as instruções do fabricante. As mutações foram confirmadas por sequenciamento automático, e inserções mutagenizadas foram subclonadas em vectores de expressão.

O Quadro 20 proporciona as sequências de nucleótidos e aminoácidos da cadeia pesada mutada de anticorpo 22.1.1H-C109A. O Quadro 21 proporciona as sequências de nucleótidos e aminoácidos da cadeia leve mutada de anticorpo 23.28.1. Os codões ADN mutados são mostrados em *itálico*. O resíduo de aminoácido mutado está em **negrito**.

Quadro 3: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 3.1.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de ADN da cadeia pesada	<u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT</u>CAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCAAAGGATGGAGGTAATAAATACCAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAATGCGCTGTATCTGCAAAT GAATAGCCTGAGAGTTGAAGACACGGCTGTGTAT TACTGTGTGAGAAGAGGGCATCAGCTGGTTCCTGG GATACTACTACTACAACGGTCTGGACGTCTGGGG CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCT GCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTC CTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACA CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC GAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAG GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAAC GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de proteína da cadeia pesada	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u> <u>VISKDGGNKYHADSVKGRFTISRDN SKNALYLQMN</u> <u>SLRVEDTAVYYCVRRGHQLVLGYYYNGLDVWG</u> <u>QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> <u>VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCCVECP PCP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVS</u> <u>NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP</u> <u>PMLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
Sequência de ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> <u>GCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC</u> <u>CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG</u> <u>TCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGATAACAAC TTT</u> <u>TGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC</u> <u>ACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCT</u> <u>CCGGGGTCCCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGATC</u> <u>AGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGATTG</u> <u>GAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC</u> <u>AAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGCCAAGG</u> <u>GACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGC</u> <u>ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC</u> <u>AGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT</u> <u>GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA</u> <u>CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA</u> <u>ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA</u> <u>AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC</u> <u>GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT</u> <u>CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC</u> <u>TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT</u> <u>GTTAG</u>
Sequência de proteína da cadeia leve	<u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVLTQSPLSLPVT PG</u> <u>EPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPGQSPQLLI</u> <u>YLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDVG</u> <u>VYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP</u> <u>SDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNAL</u> <u>QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHK</u> <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATGCGCT GTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGAGGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAACGGTCT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDN SKNALYLQMNSLRVEDTAVYYCVRRGHQL VLGYYYNGLDVWGQGTTVTVSS
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia leve	GATATTGTGCTGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGATAGTAATGGAT ACAACTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGATTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCAATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia leve	DIVLTQSPFLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLYSNGYNFL DWYLOKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGT DFTLKISRLEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTKV EIK
ADN da cadeia pesada (domínio variável) (3.1.1H-A78T) SEQ ID NO: 89	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT TCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATaCGCT GTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGTTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAAGAGGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAACGGTCT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada (domínio variável) (3.1.1H-A78T) SEQ ID NO: 90	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDN SKN 7LYLQMNSLRVEDTAVYYCVR RGH QLV LGYYYYNGLDVWGQGTITVTVSS
ADN da cadeia pesada (domínio variável) (3.1.1H-A78T-V88A-V97A) SEQ ID NO: 91	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGTTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAAGGATGGAGGT AATAAATACCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGAT TCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAATaCGCT GTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGcTGAAGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGcGAGAAGAGGGGCATC AGCTGGTTCTGGGATACTACTACTACAACGGTCT GGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC TCCTCA
Proteína da cadeia pesada (domínio variável) (3.1.1H-A78T-V88A-V97A) SEQ ID NO: 92	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISKDGGNKYHADSVKGRFT ISRDN SKN 7LYLQMNSLR VED TAVYYC VR RGHQLV LGYYYYNGLDVWGQGTITVTVSS
ADN da cadeia leve (domínio variável) (3.1.1L-L4M-L83V) SEQ ID NO: 93	GATATTGTGaTGA CT CAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGAT ACAAC TTTT TGGATTGGTACCTGCAGAAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATITGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCA GT GG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAgTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
Proteína da cadeia leve (domínio variável) (3.1.1 L-L4M-L83V) SEQ ID NO: 94	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNF LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Quadro 4: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 7.1.2

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de ADN da cadeia pesada	<u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGGTGCAGCTG</u> GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCAAATGATGGAGATAATAAATACCAT GCAGACTCCGTGTGGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAGGAGCACGCTTTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTATAT TACTGTGCGAGAAGAGGCATGGGGTCTAGTGGG AGCCGTGGGGATTACTACTACTACTACGGTTTGG ACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC CTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACC CAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCA GCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCA AATGTTGTGTGAGTGCCACCGTGCCACGACC ACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC CCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGA CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGG AGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA TGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de proteína da cadeia pesada	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u> VISNDGDNKYHADSVWGRFTISRDNRSSTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRGMGSSSGSRGDYYYYYGLDV WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVD KTVRKCCVECPAPFVAGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTFRVVSIVTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTKTKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
Sequência de ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGATACAACTTTT TGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCC ACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCT CCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATC AGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTG GAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGC AAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAGG GACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGC AGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Sequência de proteína da cadeia leve	<u>MRLPAQLLGLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> <u>GEPASISCRSSQSLLYSNGYNFLDWYLQKPGQSPQL</u> LIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCAAATGATGGAGATA ATAAATACCATGCAGACTCCGTGTGGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAGGAGCACGCTT TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGAGGCATGGG GTCTAGTGGGAGCCGTGGGGATTACTACTACTAC TACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISNDGDNKYHADSVWGRF TISRDNRSRSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGMGS SGSRGDYYYYYGLDVWGQGTTVTVSS
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia leve	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCTTGTATAGTAATGGAT ACAACTTTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia leve	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNF LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Quadro 5: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 10.8.3

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de ADN da cadeia pesada	<u>ATGAAACACCTGTGGTCTTCCTCCTGCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGC AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGTAGTTACTACTGGATCTGGATCCGGC AGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGC GTGTCTATACCAGTGGGAGCACCAACTACAACCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATGTCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCT CTGTGACCGCCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAGATGGTCTTTACAGGGGGTACGGTATG GACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGG CGTCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCAGCT GTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCAC CCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCC AGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGC AAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCCACGAC CACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTAC GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTT CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGG ACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG TCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de proteína da cadeia pesada	<u>MKHLWFFLLLVAA</u> PRWVLSQVQLQESGPGLVKPS TSLTCTVSGGSISSYYWTWIRQPAGKGLEWIGRVY TSGSTNYNPSLKSRTVMSVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDGLYRGYGMDVWGQGTITVTVSSAS TKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR VVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMMLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
Sequência de ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC</u> <u>TGCTCTGGTTCCCAAGTTCCAGATGCGACATCCA</u> GATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG TAGGAGACAGAGTCACCATCACCTGTGCGGGCGAG TCAGCCTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAG CAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATTT ATTCTGCCTCCGGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATC AAGGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTT ACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATT TTGCAACTTACTATTGTCAACAGACTGACAGTTTC CCGCTCACTTTCGGCGGGCGGGACCAAGGTGGAGA TCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCTCCGATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGT GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
Sequência de proteína da cadeia leve	<u>MRLPAOLLGLLLWFPGSRC</u> DIQMTQSPSSVSASVG DRVITTCRASQPISSWLAWYQQKPKAPKLLIYSAS GLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQ QTDSEPLTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGTAGTTACTACTGG ATCTGGATCCGGCAGCCCCGCCGGAAGGGACTG GAATGGATTGGGCGTGTCTATACCAGTGGGAGCA CCAACCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAC CATGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCC CTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGTCTTTACAG GGGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGAC CACGGTCACCGTCTCCTCA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWIWI RQPAGKGLEWIGRVYTSGSTNYPNPSLKSRVTMSVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGLYRGYGM DVWGQGTTVTVSS
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia leve	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGCCTATTAGCAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAA CTCCTGATTTATTCTGCCTCCGGTTTGCAAAGTGG GGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGC CTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGAC TGACAGTTTCCCGCTCACTTTCGGCGGCGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia leve	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTTCRASQPISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYSASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQTDSFPLTFGGGTKVEIK

Quadro 6: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 15.1.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de ADN da cadeia pesada	<u>ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAAAGTTACTACTGGACCTGGATCCGGC AGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGAT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAATCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ATGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTTTATTACTG TGCGAGAAAGGGTGACTACGGTGGTAATTTTAAC TACTTTCACCAGTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA CCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCACCGTGCC CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGG ACGTGAGTCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAAC TACAAGACCACACCTCCCATGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de proteína da cadeia pesada	<u>MKHLWFFLLLVAA</u> PRWVLSQVQLQESGPGLVKPS TLSLTCTVSGGSIRSYWTWIRQPPGKGLEWIGYTY YSGSTNYPNPSLKSRVTISVDMSKNQPSLKLSSVTAA DTAVYYCARKGDYGGNFNYFHQWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMQLSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKS LSLSPGK
Sequência de ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTACATACTAATGGATACAACTAT TTCGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAACTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCGTACAGTTTGGCCAGG GGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Sequência de proteína da cadeia leve	<u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> PGEASISCRSSQSLHTNGYNYFDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQALQTPYSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKH KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGOCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTG GACCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGATATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAATCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACATGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTTTATTACTGTGCGAGAAAGGGTGACTACG GTGGTAATTTAACTACTTTACCAGTGGGGCCA GGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRSYYWTW IRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISVD MSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARKGDYGGNFN YFHQWGQGTLTVSS
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia leve	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTACATACTAATGGAT ACAAC TATTTTCGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCGTACAGTTT TGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia leve	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHTNGYNY FDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYSFGQGTK LEIK

Quadro 7: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 21.4.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de ADN da cadeia pesada	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGG</u> <u>CAGCAGCCACAGGAGCCCACTCCCAGGTGCAGCT</u> GGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGG GGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGA TACACCTTCACCGGCTACTATATGCACTGGGTGC GACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGG GATGGATCAACCCTGACAGTGGTGGCACAACTA TGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCATGACC AGGGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATGGAGC TGAACAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCGAGAGATCAGCCCCTAGGATATTGT ACTAATGGTGTATGCTCCTACTTTGACTACTGGG GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCC TGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACC AGCGGCGTGACACACCTTCCCAGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAC CGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTAC ACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGT CGAGTGCCCAACCGTGCCCAAGCACCACCTGTGGCA GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGG GAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGG CTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACC ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Sequência de proteína da cadeia pesada	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAEVKKPG</u> <u>ASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGGLEWM</u> <u>GWINPDSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA</u> <u>YMELNRLRSDDTAVYYCARDQPLGYCTNGVCSYFDYWG</u> <u>QGT</u> <u>LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL</u> <u>VKD</u> <u>YFPEP</u> <u>VT</u> <u>SVWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY</u> <u>SLSSV</u> <u>VT</u> <u>PSSNFGTQTYTCNV</u> <u>DHKPSNTKVDKTV</u> <u>ERKCC</u> <u>VEC</u> <u>PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT</u> <u>PEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK</u> <u>PREEQFNSTFRVSVLTVVHQD</u> <u>WLN</u> <u>GKEYKCKVS</u> <u>NKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK</u> <u>NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TT</u> <u>P</u> <u>PMLDS</u> <u>DGSF</u> <u>FLYSKLTVDKSRWQQGNV</u> <u>FSCSV</u> <u>MHE</u> <u>ALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
Sequência de ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC</u> <u>TGCTCTGGTTC</u> <u>CCCAGGTTC</u> <u>CAGATGCGACATCCA</u> <u>GATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTG</u> <u>TAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGT</u> <u>CGGGCGAG</u> <u>TCAGGGTATTTACAGCTGGTTAGCCTGGTATCAG</u> <u>CAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATCT</u> <u>ATACTGCATCCACTTTACAAAGTGGGGTCCCATC</u> <u>AAGGTT</u> <u>CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTC</u> <u>ACTCTCA</u> <u>CCATCAGCAGCCTGCAACCTGAAGATT</u> <u>TTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACATTTTC</u> <u>CCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGA</u> <u>TCAAACGA</u> <u>ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT</u> <u>CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA</u> <u>ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA</u> <u>TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA</u> <u>TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGT</u> <u>GTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC</u> <u>AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA</u> <u>GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTCCGAA</u> <u>GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA</u> <u>AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</u>
Sequência de proteína da cadeia leve	<u>MRLPAQLLGLLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVG</u> <u>DRV</u> <u>TTICRASQGIYSWLAWYQQKPGKAPNLLIYTA</u> <u>STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> <u>ISSLPEDFATYYC</u> <u>QQANIFPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL</u> <u>KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS</u> <u>QESVTEQDSKDS</u> <u>TYSL</u> <u>SSTLTLSKADYEKHKVYAC</u> <u>EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCTTCTGGATACACCTTCACCGGCTACTATATG CACTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTG AGTGGATGGGATGGATCAACCCTGACAGTGGTGG CACAACTATGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTC ACCATGACCAGGGACACGTCCATCAGCACAGCCT ACATGGAGCTGAACAGGCTGAGATCTGACGACA CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATCAGCCCCT AGGATATTGTACTAATGGTGTATGCTCCTACTTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTC CTCA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia pesada	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYM HWVRQAPGQGLEWMGWINPDSGGTNYAQKFQGR VTMTRDTSISTAYMELNRLRSDDTAVYYCARDQPL GYCTNGVCSYFDYWGGTLVTVSS
Domínio variável maturo de Sequência de ADN da cadeia leve	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGT CTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG TCGGGCGAGTCAGGGTATTTACAGCTGGTTAGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAC CTCCTGATCTATACTGCATCCACTTTACAAAGTGG GGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAAC CTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGC TAACATTTTCCCGCTCACTTTCGGCGGAGGGACC AAGGTGGAGATCAAA
Domínio variável maturo de Sequência de proteína da cadeia leve	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIYSWLAWY QQKPGKAPNLLIYTASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFI LTISSLQPEDFATYYCQQANIFPLTFGGGTKVEIK

Quadro 8: ADN e sequências de proteínas de domínios variáveis maduros do anticorpo 21.2.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGTCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGG AGTGGGTGGCAGTTATGTCATATGATGGAAGTAG TAAATACTATGCAAACCTCCGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGT ATCTGCAAATAAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGGGGTAA AGCAGTGCCTGGTCTGACTACTGGGGCCAGGGA ATCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína da cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYVMH WVRQAPGKGLEWVAVMSYDGSSKYYANSVKGRF TISRDNSKNTLYLQINSLRAEDTAVYYCARDGGKA VPGPDYWGGILVTVSS
ADN da cadeia leve	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGTGTTCTGTATAGTAATGGAT ACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGTTTTACAACTCCATTCACCTTC GGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAC
Proteína da cadeia leve	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSVLYSNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQVLQTPFTFGPGTK VDIK

Quadro 9: ADN e sequências de proteínas de domínios variáveis maduros do anticorpo 22.1.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTCGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGGAGGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTACGAGAAGAGGGACTGG AAAGACTTACTACCACTACTGTGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína da cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISSDGGNKYYADSVKGRFT ISRDNSKNILYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRGTGKT YYHYCGMDVWGQTTVTVSS
ADN da cadeia leve	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGAT ATAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACACCTCCTGATCTAFTTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTG CAGTGGTTCAGGCACTGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Proteína da cadeia leve	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSNGYNY LDWYLQKPGQSPHLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Quadro 10: ADN e sequências de proteínas de domínios variáveis maduros do anticorpo 23.5.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG TAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAATTATATCATATGATGGAAGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATGTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGAC ACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGCGGTCACT ACGGGAGGGATTACTACTCCTACTACGGTTTGGG CGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC TCAG
Proteína da cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSNYGMH WVRQAPGKGLEWVAIISYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYVQMNSLRAEDTAVYYCARRGHYGR DYYSYYGLDVWGQGTTVTVSS
ADN da cadeia leve	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCTCCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGAT ACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGG CAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Proteína da cadeia leve	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLPQNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Quadro 11: ADN e sequências de proteínas de domínios variáveis maduros do anticorpo 23.28.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGACACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTATTGTGCGAGAAAGGGGGGCCTCT ACCGTGACTACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína da cadeia pesada	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGGSIRGYYS WIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSKLNSVTAADTAVYYCARKGGLYGDY GWFAPWGQGT LVTVSS
ADN da cadeia leve	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCGACTTA GCCTGGCACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GACTCCTCATCTATCGGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGAGCA CTGTCTGAGCTTATTCACCTTCGGCCCTGGGACCA AAGTGGATATCAAAC
Proteína da cadeia leve	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSDLAWH QQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQHCRSLFTFGPGTKVDIK
ADN da cadeia pesada (domínio variável) (23.28.1H-D16E) (SEQ ID NO: 97)	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCTGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAACTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTATTGTGCGAGAAAGGGGGGCCTCT ACCGTGACTACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína da cadeia pesada (domínio variável) (23.28.1H- D16E) (SEQ ID NO: 98)	QVQLQESGPGLVKPSDTLSLTCTVSGGSIRGYYS WIRQPPGKGLEWIGYIYSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSKLNSVTAADTAVYYCARKGGLYGDY GWFAPWGQGT LVTVSS

Quadro 12: ADN e sequências de proteínas de domínios variáveis maduros do anticorpo 23.29.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA:
ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATATGATGGAAGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTACAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACGCGGTCACTA CGGGAATAATTACTACTCCTATTACGGTTTGGAC GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCT CAG
Proteína da cadeia pesada	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMH WVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFT IYRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHYG NNYYSYYGLDVWGQGTTVTVSS
ADN da cadeia leve	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCC CGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGC AGGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGAT ACAAC TATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGG GCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTA ATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGG CAGTGGCTCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATT ACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTT CGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
Proteína da cadeia leve	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLPGNGYNY LDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPRFSGSGSG TDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQALQTPRTFGQGTK VEIK

Quadro 13: ADN e sequências de proteínas de domínios variáveis maduros de anticorpo 24.2.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA
ADN da cadeia pesada	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTG GTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA CTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGAGGTTACTACTG GAGCTGGATCCGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACT GGAGTGGATTGGGTATATCTATTACAGTGGGAGC ACCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCA CCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC CCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACG GCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGGGGCCTCT ACGGTGACTACGGCTGGTTCGCCCCCTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína da cadeia pesada	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIRGYYS WIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARRGGLYGDY GWFAPWGQGTLLTVSS
ADN da cadeia leve	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTA GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA GTATAGTAGCTTATTCACCTTCGGCCCTGGGACC AAAGTGGATATCAAAC
Proteína da cadeia leve	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYSSLFTFGPGTKVDIK

Quadro 14: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 21.2.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada	<u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCCTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGT</u>CAGGTGCAGCTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGTCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATGTCATATGATGGAAGTAGTAAATACTAT GCAAACCTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT AAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGAGATGGGGGTAAAGCAGTGCCTG GTCCTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACT CGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG AGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA CTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTC GGCACCCAGACCTACACCTGCAACGATAGATCACA AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTG AGCGCAAATGTTGTGTGCGAGTGCCCAACCGTGCCC AGCACCACTGTGGCAGGACCGTCACTCTTCCTC TTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTACGTTGCGTGGTGGTGGG CGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA CGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCAC CAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCG GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLRLSCAASGFTFSSYVMHWVRQAPGKGLEWVA</u> VMSYDGSSKYYANSVKGRFTISRDNKNTLYLQINS LRAEDTAVYYCARDGGKAVPGPDYWGQGILVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECP PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGTGTTCTGTATAGTAATGGATACTAAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGAT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG CAAGTTTTACAACTCCATTCACTTTCGGCCCTGG GACCAAAGTGGATATCAAACGAACTGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACA GTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG TTAG

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia leve	<u>MRLPAOLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPISLPVTP</u> GEPASISCRSSQSVLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCMQVLQTPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Quadro 15: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 22.1.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada	<u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTTCCTCGTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGTGCAACTG</u> GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTCGCTATGGCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATCTGATGGAGGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTACGAGAAGAGGGACTGGAAAGACTTACT ACCACTACTGTGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGG GACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCA GGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAG GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC CTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGC AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGAGT GCCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCG AGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGA GCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC CTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCC TCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAAC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACAC CTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u> <u>VISSDGGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN</u> <u>SLRAEDTAVYYCTRRGTGKTYHYCGMDVWGQG</u> <u>TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPSNTKVDKTVRK</u> <u>CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</u> <u>EQFNSTFRVVSVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKG</u> <u>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS</u> <u>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLD</u> <u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPGK</u>
ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> <u>GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC</u> <u>CTGGAGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG</u> <u>TCAGAGCCTCCTGTATAGTAATGGATATAACTAT</u> <u>TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC</u> <u>CACACCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC</u> <u>TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGTT</u> <u>CAGGCACTGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT</u> <u>GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG</u> <u>CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAG</u> <u>GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG</u> <u>CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG</u> <u>CAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCT</u> <u>GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA</u> <u>CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA</u> <u>ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA</u> <u>AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCYTGAC</u> <u>GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT</u> <u>CTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC</u> <u>TCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT</u> <u>GTTAG</u>
Proteína da cadeia leve	<u>MRLPAOLLGLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVTP</u> <u>GEPASISCRSSQSLLYSNGYNYLDWYLQKPGQSPHL</u> <u>LIYLGSNRASGVPRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV</u> <u>GVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP</u> <u>PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA</u> <u>LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

Quadro 16: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 23.5.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada	<u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTTCTTCGTTGC</u> <u>TCTTTTAAGAGGTGTCCAGTGTCAAGTGCAGCTG</u> GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGATT CACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGGTCCGC CAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA ATTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATGTGCAAATG AACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATT ACTGTGCGAGACGCGGTCACTACGGGAGGGATTA CTACTCCTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAA GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCA AGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTC CAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCTCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAACTTCGGCAACCAGACCTACACCT GCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCGA GTGCCCACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGGA CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCC GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGG AGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAAGCGT CCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAA CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAA CCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACA CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPG</u> <u>RSRLRLSCVASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVA</u> <u>HSYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYVQMNS</u> <u>LRAEDTAVYYCARRGHYGRDYYSYGLDVWGQG</u> <u>TTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK</u> <u>DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS</u> <u>SVVTVPSSNFGTQTYTCNV D HKPSNTKVDKTV ERK</u> <u>CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE</u> <u>EQFNSTFRVVS VLT V VHQDWLNGKEYKCKVSNKG</u> <u>LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSRBEMTKNQVS</u> <u>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPMLD</u> <u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHN</u> <u>HYTQKSLSLSPGK</u>
ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGGATATTGT</u> <u>GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC</u> <u>CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG</u> <u>TCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGATACA ACTAT</u> <u>TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC</u> <u>CACAGCTCCTGATCTATT TGGGTTCTAATCGGGCC</u> <u>TCCGGGGTCCCTGACAGGTT CAGTGGCAGTGGAT</u> <u>CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT</u> <u>GGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATG</u> <u>CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAG</u> <u>GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG</u> <u>CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG</u> <u>CAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTSTGTTGTGTGCCT</u> <u>GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA</u> <u>CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA</u> <u>ACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA</u> <u>AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCYTGAC</u> <u>GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT</u> <u>CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC</u> <u>TCGCCC GT CACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT</u> <u>GTAA</u>
Proteína da cadeia leve	<u>MRLPAQLLGLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> <u>GPASISCRSSQSLLPGNGYNYLDWYLQKPGQSPQL</u> <u>LIYLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV</u> <u>GVYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFP</u> <u>PSDEQLKSGTAXVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNA</u> <u>LQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLT LSKADYEKH</u> <u>KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>

Quadro 17: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 23.28.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada	<u>ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCCCTGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAACT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTATTG TGCGAGAAAGGGGGGCTCTACGGTGACTACGG CTGGTTCGCCCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACACCTT CCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTGTCGAGTGCCCAACCGTGCC CAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada	<u>MKHLWFFLLLVAA</u> PRWVLSQVQLQESGPGLVKPS TSLTCTVSGGSIRGYYSWIRQPPGKGLEWIGYTY YSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSVTAA DTAIVYYCARKGGLYGDYGWFAFWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPS SNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVRKKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTIVHQDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKS LSLSPGK
ADN da cadeia leve	<u>ATGGAAACCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCT</u> <u>ACTCTGGCTCCAGAAATCCACCGGAGAAATTGTG</u> TTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCAGCGACTTAGCCTGGCACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGACTCCTCAT CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACTGTCGTAGCT TATTCACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
Proteína da cadeia leve	<u>METPAQLFLLLLWL</u> PESTGEIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVSSDLAWHQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QHCRSLFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Quadro 18: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo 23.29.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada	<u>ATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGGTTTCCTCGTTGC</u> <u>TCITTTTAAGAGGTGTCCAGTGT</u>CAGGTGCAACTG GTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGG AGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATGCCATGCACTGGGTCCG CCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGC AGTTATATCATATGATGGAAGTAATAAATACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTACA GAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAAT GAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTAT TACTGTGCGAGACGCGGTCACTACGGGAATAATT ACTACTCCTATTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCA AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCT CCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACC TGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTGCG AGTGCCACCGTGCCCAGCACCACTGTGGCAGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC CGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAG GAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGG CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA ACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACA CCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada	<u>MEFGLSWVFLVALLRGVOCQVQLVESGGGVVQPG</u> RSLRLSCAASGFTFSYAMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTTYRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARRGHYGNYYSYGLDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVR KCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPAIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPM LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
ADN da cadeia leve	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGATACTAATAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGCT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAACTCCTCGGACGTTTCGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTT CAGTGGAGGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Proteína da cadeia leve	<u>MRLPAQLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> <u>GEPAISCRSSQSLLPGNGYNYLDWYLQKPGQSPQL</u> LIYLGSNRASGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GIYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWRVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia leve (23.29.1LR174K) (SEQ ID NO:101)	<u>ATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTAA</u> <u>TGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGT</u> GATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCC CTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAG TCAGAGCCTCCTGCCTGGTAATGGATACAACATAT TTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTC CACAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCC TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCA GTGGCAGTGGCT CAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGT GGAGGCTGAGGATGTTGGGATTTATTACTGCATG CAAGCTCTACAAACTCCTCGGACGTTCCGGCCAAG GGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTG CACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTT CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGT CTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGC TCGCCCCTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGT GTTAG
Proteína da cadeia leve (23.29.1LR174K) (SEQ ID NO:101)	<u>MRLPAOLLGLLMLWVSGSSGDIVMTQSPLSLPVT</u> <u>GEPAISICRSSQSLLPGNGYNYLDWYLQKPGQSPQL</u> LIYLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GIYYCMQALQTPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Quadro 19: Sequências de ADN e proteínas do anticorpo
24.2.1

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada	<u>ATGAAACATCTGTGGTTCTTCCTTCTCCTGGTGGC</u> <u>AGCTCCCAGATGGGTCCCTGTCCCAGGTGCAGCTG</u> CAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGG AGACCCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGC TCCATCAGAGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGGC AGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGGT ATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCC CTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGTT CTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTG TGCGAGAAGGGGGGGCCTCTACGGTGACTACGG CTGGTTCGCCCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG TCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCC GAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTT CCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT GAGCGCAAATGTTGTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCC CAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGC ACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTG ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACA TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAATGA

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
Proteína da cadeia pesada	<u>MKHLWFFLLLVAA</u> PRWVLSQVQLQESGPGLVKPSSE TLSLTCTVSGGSIRGYYWSWIRQPPGKGLEWIGYTY YSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARRGGLYGDYGWFAFWGQGTILVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPS SNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECP CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTF RVVSVLTIVHQDWLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEK TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDLAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSGDSFLL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFVMSHEALHNHYTQKS LSLSPGK
ADN da cadeia leve	<u>ATGGAAACCC</u> CAGCGCAGCTTCTCTCCTCCTGCT <u>ACTCTGGCTCC</u> CAGATACCACCGGAGAAATTGTG TTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTGTTAGCAGCACCTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACT TCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGA TTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATAGTAGCT TATTCACCTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATAT CAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGAT AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
Proteína da cadeia leve	<u>METPAQLLELLLWLP</u> DTTGEIVLTQSPGTLISLSPGE RATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYSSLFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Quadro 20: ADN e sequências de proteínas dos domínios variáveis maduros de anticorpo 22.1.1H-C109A

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia pesada (SEQ ID NO: 95)	CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTG GTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTG CAGCCTCTGGATTACCTTCAGTCGCTATGGCAT GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTG GAGTGGGTGGCAGTTATATCATCTGATGGAGGTA ATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT CACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTG TATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA CGGCTGTGTATTACTGTACGAGAAGAGGGACTGG AAAGACTTACTACCACTACGCCGGTATGGACGTC TGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG
Proteína da cadeia pesada (SEQ ID NO: 96)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSRYGMH WVRQAPGKGLEWVAVISSDGGNKYYADSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRGTGKT YYHYAGMDVWGQGTITVTVSS

Quadro 21: ADN e sequências de proteínas dos domínios variáveis maduros de anticorpo 23.28.1L-C92A

DESCRIÇÃO:	SEQUÊNCIA (sequência sinal sublinhada):
ADN da cadeia leve (SEQ ID NO: 99)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGT CTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTG CAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCGACTTA GCCTGGCACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GACTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCAC TGGCATCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGG AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCA CGCCCGTAGCTTATTCACCTTCGGCCCTGGGACC AAAGTGGATATCAAAC \\
Proteína da cadeia leve (SEQ ID NO: 100)	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSDLAWH QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQHLARSLFTFGPGTKVDIK

EXEMPLO III

Análise de Substituições de Aminoácidos da Cadeia Pesada e Leve

As Figuras 1D-1H e 2D-2H proporcionam alinhamentos de sequência entre as sequências de aminoácidos domínio

variável de cadeia pesada preditas dos anticorpos monoclonais 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 22.1.1H-C109A, 23.5.1, 23.28.1, 23.28.1H-D16E, 23.29.1 e 24.2.1 anticorpos e as sequências de aminoácidos de linha germinal dos seus respectivos genes. A maioria das regiões CDR3 de cadeia pesada contém inserções de aminoácidos.

O gene DLR1 usado no domínio V_H de anticorpo 21.4.1 codifica dois resíduos de cisteína (Cys). A análise de espectrometria de massa e modelagem de homologia demonstraram que os dois resíduos de Cys são ligados por ponte de dissulfeto, e que esta ligação de dissulfeto não quebra a estrutura do anticorpo.

As Figuras 1A-1C e 2A-2C proporcionam alinhamentos de sequência entre as sequências de aminoácidos de cadeia leve variável preditas dos anticorpos monoclonais 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.28.1, 23.28.1L-C92A, 23.29.1 e 24.2.1 clones e as sequências de aminoácidos de linha germinal dos seus respectivos genes. As cadeias leves destes anticorpos são derivadas a partir de três genes V_k diferentes. Sete dos onze anticorpos usam o gene V_k A3/A19, seis de que têm duas mutações na CDR1 região. Além disso, cinco dos sete anticorpos que utilizam o gene V_k A3/A19, também usam o gene J_k1 ; em todos estes anticorpos o primeiro aminoácido derivado a partir do gene J_k1 é consistentemente alterado de um W a um R.

Será apreciado que muitos das substituições identificadas acima de aminoácidos ou inserções existem em proximidade imediata a ou dentro de uma CDR. Tais substituições parecem possuir algum efeito sobre a ligação do anticorpo à molécula de CD40. Além disso, tais substituições poderiam ter um efeito significativo sobre a afinidade dos anticorpos.

EXEMPLO IV

Reactividade Cruzada de Espécies dos Anticorpos da Invenção

Análises de FACS foram realizadas para determinar a ligação e afinidade dos anticorpos da invenção para CD40 de várias espécies, particularmente certos macacos do velho mundo. Incubaram-se alíquotas de sangue completo humano e de macaco durante 1 hora em gelo com concentrações crescentes dos anticorpos anti-CD40 da invenção exemplificados no presente documento ou com um anticorpo anti-hemocianina de molusco keyhole (KLH) como um controlo negativo. Incubaram-se então as amostras durante 30 minutos em gelo com RPE conjugado com IgG2 anti-humano (ficoeritrina). A ligação foi medida por citometria de fluxo de células B CD 19/CD20 positivas e os histogramas de intensidade de fluorescência (F12-H) versus número de células (Contagens) foram analisados usando software CellQuest. A ligação foi estimada (K_D) para cada anticorpo a partir dos gráficos de intensidade de fluorescência média versus concentração de anticorpos. Controlou-se a depleção do anticorpo por meio da medição da ligação ao longo de um intervalo de concentrações celulares.

Os anticorpos 3.1.1, 7.1.2, 10.8.3, 15.1.1 e 21.4.1 foram testados para a ligação a células B humanas, rhesus e cinomolgos. Também se testou os anticorpos 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.25.1, 23.28.1, 23.29.1 e 24.2.1 para a ligação a células B humanas e cinomolgos.

Observou-se que o sinal máximo e a concentração para metade da ligação máxima to macaco células, foi dentro de um factor de dois ao correspondente parâmetros para células B humanas. Nenhuma ligação foi observada em experiências similares com sangue de ratinho, rato, coelho e cão.

EXEMPLO V

Selectividade dos anticorpos para CD40

Realizou-se outro ensaio *in vitro* para determinar a selectividade dos anticorpos da invenção com respeito a CD40.

ELISA de Selectividade CD40: Materiais e Métodos

Cobriu-se uma placa de 96 poços FluroNUNC (N° de Cat. Nunc 475515) com quatro antigénios: CD40/Ig, CD44/Ig, RANK/Ig, 4-1BB/Ig, TNFR-1/Ig e TNFR-2/Ig (antigénios gerados no laboratório), durante a noite a +4 °C a 1 µg/ml de 100 µl/poço em 0,1 M de tampão bicarbonato de sódio, pH 9,6. Em seguida lavou-se a placa com PBST (PBS + 0,1 % Tween-20) três vezes e bloqueou-se a placa com PBST+0,5 % de BSA a 150 µl/poço. Incubou-se a placa a temperatura ambiente durante 1 hora e em seguida lavou-se com PBST três vezes. Em seguida, diluiu-se os anticorpos anti-CD40 gerados no Exemplo I em bloco a 1 µg/ml e adicionou-se os anticorpos diluídos à placa. Incubou-se a placa a temperatura ambiente durante 1 hora em seguida lavou-se com PBST três vezes. Em seguida tratou-se os poços que continham os anticorpos gerados no Exemplo I com 100 µl/poço de IgG2-HRP anti-humano (Southern Biotech N° de Cat. 9070-05) num 1:4000 diluição em bloco. Também, tratou-se uma fila com IgG anti-humano (N° de Cat Jackson 209-035-088) diluído até 1:5000 em bloco e adicionado a 100 µl/poço para normalizar para o revestimento de placa. Também tratou-se uma fila com anti-CD40 humano-HRP (N° de Cat Pharmingen 345815/Custom HRP conjugado) a 0,05 mg/ml diluído em bloco como um controlo positivo. Incubou-se a placa a temperatura ambiente durante 1 hora e em seguida lavou-se com PBST três vezes. Adicionou-se substrato TMB (K & P Labs) a 100 µl/poço e incubou-se a placa durante 5 a 10 minutos. Em seguida leu-se a placa usando um leitor de placa Spectra-Max™. Os resultados mostraram que os anticorpos têm uma selectividade para CD40 que é pelo menos 100 vezes maior que sua selectividade para RANK, 4-1BB, TNFR-1 e TNFR-2 em que o sinal específico de CD40 (sinal de CD40 menos fundo) é pelo menos 100X maior que o correspondente sinal para as outras moléculas.

EXEMPLO VI

Estudos de Classificação de Epítopo

Ao demonstrar que os anticorpos da invenção são selectivos para CD40, foram realizadas análise de ligação por competição usando BIAcore e FACS.

Estudos de Competição BIAcore

Realizou-se estudos de competição BIAcore para determinar se os anticorpos anti-CD40 humanos da invenção se ligam ao mesmo local ou a distintos locais na molécula de CD40.

Nestas experiências usou-se um instrumento BIAcore 2000, seguindo os protocolos do fabricante. A Proteína A foi imobilizada nas superfícies de chip de sensor do BIAcore. Uma concentração de saturação de CD40-Ig que compreende o domínio extracelular de CD40 foi unida ao chip do sensor. Em seguida ligou-se um primeiro anticorpo agonista humano anti-CD40 da invenção, um anticorpo anti-CD40 comercial ou CD40L ao CD40 ligado ao chip de sensor sob condições de saturação. Em seguida mediu-se a capacidade de um segundo agonista de anticorpo humano anti-CD40 da invenção para competir com o primeiro anticorpo, anticorpo comercial ou CD40L para a ligação a CD40. Esta técnica permitiu designar os anticorpos a diferentes grupos de ligação. A ligação a CD40 indicou o reconhecimento de um epítopo independente. A falta de ligação pode indicar reconhecimento do mesmo epítopo ou epítomos sobrepostos.

Estudos de FACS

Realizou-se estudos FACS para determinar se os anticorpos anti-CD40 humanos da invenção se ligam ao mesmo local ou a distintos locais na molécula de CD40, e para determinar se se ligam ao mesmo local ou a distintos locais na molécula de CD40 como anticorpos anti-CD40 comercialmente disponíveis EA5 (Nº de Cat. Alexis ANC-300-050), LOB7/6 (Serotec MCA/590PE) e 5C3 (Pharmingen # 555458 (não marcado) e 555460 (PE marcado for FACS)).

Contou-se e marcou-se células dendríticas tratadas com anticorpos anti-CD40 da invenção com PE marcado EA5 ou PE

marcado LOB7/6 anticorpo em gelo durante 30 minutos. Após uma lavagem, a coloração de células foi analisada num citómetro de calibre B-D. A ligação reduzida dos anticorpos comerciais foi interpretada como uma indicação de que o anticorpo de teste se uniu ao mesmo ou epítipo sobreposto.

A análise de ligação por competição por meio de BIAcore e FACS mostrou que os epítipos reconhecidos pelos anticorpos mAb 21.4.1 se sobrepõe com o epítipo reconhecido pelo anticorpo EA5, não se sobrepõe com o epítipo reconhecido pelo anticorpo LOB7/6 comercialmente disponível e não se sobrepõe com o local de ligação para CD40L. Os epítipos reconhecidos pelos anticorpos restantes da sobreposição com o local de ligação para CD40L.

O Quadro 22 resume os resultados destes epítipo classificação estudos.

QUADRO 22

Classificação de epítipo por meio de competição BIAcore de Certos Anticorpos anti-CD40 da invenção							
	EA5	5C3	LOB7/6	3.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.29.1	21.4.1	23.25.1, 23.28.1, 24.2.1	CD40 L
EA5	X	x			X		X
5C3	X	X			X	X	X
LOB7/6			X	x		X	X
3.1.1, 21.2.1, 22.1.1, 23.5.1, 23.29.1			X	X			X
21.4.1	X	x			X		
23.25.1, 23.28.1, 24.2.1		X	X			X	x
CD40L	x	x	x	X		x	X

EXEMPLO VII

Regulação positiva de Moléculas de superfície por anticorpos anti-CD40

Realizou-se um ensaio de sangue completo para determinar se os anticorpos anti-CD40 humanos da invenção regulam positivamente a expressão de moléculas de superfície de células B.

Sangue completo Humano ou primata foi diluído 1:1 com meio RPMI e incubado durante 24 horas com várias concentrações de anticorpos agonistas contra CD40 ou controles. Células foram corados durante 30 minutos (em gelo, no escuro) for HLA-DR, ICAM, B7-1, B7-2, CD19/CD20, CD40, CD23 e CD71, usando reagentes de anticorpo marcados com fluorocromo comercialmente disponíveis. As células foram então analisadas num FACS-Caliber (Becton-Dickinson). As células B foram identificadas por formação de ponte em células CD 19 ou CD20 positivas, e os marcadores de activação determinados para esta ponte.

As vezes de aumento máximo de fluorescência mediana (a ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ anticorpo), e a EC_{50} média obtida usando um dos anticorpos anti-CD40 da invenção reivindicada (21.4.1) são mostrados no Quadro 23.

QUADRO 23

Regulação positiva de Moléculas de superfície de células B por um Anticorpo anti-CD40 da invenção		
	Veze de aumento máximo	EC_{50} (ng/ml)
	Média +/- desvio padrão	Média +/- desvio padrão
MHC II	4,50 +/- 0,52	3,85 +/- 0,35
CD71	2,30 +/- 0,77	0,73 +/- 0,28
ICAM	4,52 +/- 2,42	15,3 +/- 7,3
CD23	69,9 +/- 25,8	19,0 +/- 4,4
B7-2	2,74 +/- 0,14	16,0 +/- 21,9

Também realizou-se experiências para determinar se os anticorpos anti-CD40 humanos da invenção regulam positivamente a expressão de moléculas de superfície de célula dendrítica derivada de monócito.

Preparação das células dendríticas derivadas de monócito

O sangue periférico foi colhido de voluntários humanos normais. Células mononucleares foram isoladas usando tubos Sigma Accuspin (St. Louis, MO), lavados com meio RPMI (Gibco BRL, Rockville, MD) e colocados em balões de cultura de tecido a 5×10^6 /ml em meio RPMI completo (contendo 100 U/ml de penicilina/estreptomicina, 10 mM de tampão HEPES, 2 mM de glutamina, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais; todos de Gibco BRL); e 10 % de soro fetal bovino (Hyclone, Logan, Utah). Após um 3 horas de incubação a 37 °C (5 % de CO₂), células não aderentes foram removidas e as células T foram isoladas usando colunas de selecção (R&D Systems, Minneapolis, MN). As células aderentes foram lavadas com meio RPMI e incubadas durante 7 dias em meio RPMI completo suplementado com 10 ng/ml de IL-4 (R&D Systems) e 100 ng/ml de GM-CSF (R&D Systems). As células não aderentes foram então isoladas, lavadas, e utilizadas como células dendríticas derivadas de monócito (mDCs) para todas as experiências. As células aderentes restantes foram removidas usando tripsina / EDTA e utilizadas em experiências que empregavam monócitos aderentes.

Para determinar se os anticorpos anti-CD40 da invenção regulam positivamente a expressão de marcadores de célula superfície, as células dendríticas derivadas de monócito foram cultivadas com várias concentrações dos anticorpos agonistas durante 48-72 horas, seguido por coloração (30 minutos, em gelo, no escuro) for HLA-DR, ICAM, B7-1, B7-2, CD40 e CD83, usando reagentes de anticorpo marcado com fluorocromo comercialmente disponíveis. As células foram então analisadas num FACS-Caliber (Becton-Dickinson).

As vezes de aumento máximo de fluorescência mediana (a $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ de anticorpo), e a EC₅₀ média obtida usando um dos anticorpos anti-CD40 da invenção reivindicada (21.4.1) são mostrados no Quadro 24.

QUADRO 24

Regulação positiva de Moléculas de superfície de células dendríticas por um Anticorpo anti-CD40 da invenção		
	Veze de aumento máximo	EC ₅₀ (ng/ml)
	Média +/- desvio padrão	Média +/- desvio padrão
MHC II	7,7 +/- 5,6	252 +/- 353
CD83	36,3 +/- 42,2	233 +/- 262
ICAM	10,4 +/- 4,8	241 +/- 140
B7-2	21,9 +/- 9,4	71,4 +/- 44,4

Realizou-se experiências similares com células B e mDCs usando vários anticorpos anti-CD40 da invenção e marcadores adicionais. Foi medida a expressão de moléculas de superfície de células B (MHC-II, ICAM, B7-1, B7-2 e CD23) como descrito acima, mas usando 1 µg/ml do anticorpo anti-CD40. Os resultados desta experiência são apresentados no Quadro 25. Foi medida a expressão de moléculas de superfície de células dendríticas (MHC-II, ICAM, B7-1, B7-2 e CD83) após 72 horas como indicado acima, mas usando 1 µg/ml do anticorpo anti-CD40. Os resultados desta experiência são apresentados no Quadro 26. Quadros 25-26 mostram as vezes de aumento em intensidade mediana +/- desvio padrão.

QUADRO 25

Regulação positiva de B-Moléculas de superfície celular por anticorpos anti-CD40 da invenção					
	MHC Classe II	ICAM (CD54)	B7-1 (CD 80)	B7-2 (CD86)	CD23
	célula B	célula B	célula B	célula B	célula B
3.1.1	3,2 +/- 2,6	1,3 +/- 0,2	1,7 +/- 0,2	1,2 +/- 0,4	5,6 +/- 4,8
21.2.1	1,2 +/- 0,2	1,3 +/- 0,9	0,9 +/- 0,5	1,0 +/- 0,04	1,0 +/- 0,1
21.4.1	3,6 +/- 3,0	5,0 +/- 3,0	1,9 +/- 0,8	1,8 +/- 0,7	21,5 +/- 34,8
22.1.1	1,4 +/- 0,5	1,1 +/- 0,2	1,2 +/- 0,3	1,0 +/- 0,1	1,3 +/- 0,2
23.5.1	1,4 +/- 0,5	1,1 +/- 0,2	1,4 +/- 0,6	1,0 +/- 0,1	1,1 +/- 0,2

Regulação positiva de B-Moléculas de superfície celular por anticorpos anti-CD40 da invenção					
	MHC Classe II	ICAM (CD54)	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	CD23
	célula B	célula B	célula B	célula B	célula B
23,25.1	2,5 +/- 1,1	2,5 +/- 0,9	1,6 +/- 0,4	1,3 +/- 0,2	4,3 +/- 2,3
23.28.1	1,1 +/- 0,2	1,1 +/- 0,2	1,8 +/- 0,6	1,0 +/- 0,1	1,1 +/- 0,4
23,29.1	1,2 +/- 0,2	1,0 +/- 0,2	1,3 +/- 0,6	0,9 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1
24.2.1	1,8 +/- 1,0	1,6 +/- 0,8	1,1 +/- 0,4	1,1 +/- 0,2	0,9 +/- 0,6

QUADRO 26

Regulação positiva de Moléculas de superfície de células dendríticas por Anticorpos anti-CD40 da invenção					
	MHC Classe II	ICAM (CD54)	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	CD83
	DC	DC	DC	DC	DC
3.1.1	4,4 +/- 2,4	1,5 +/- 0,7	1,8 +/- 0,9	23,7 +/- 33,5	15,2 +/- 18,2
21.2.1	1,8 +/- 1,3	1,5 +/- 0,9	0,9 +/- 0,4	7,4 +/- 10,5	10,8 +/- 16,5
21.4.1	5,0 +/- 3,8	3,7 +/- 1,4	1,5 +/- 1,1	12,9 +/- 13,3	48,6 +/- 49,5
22.1.1	2,3 +/- 1,2	1,6 +/- 0,7	1,4 +/- 1,0	16,3 +/- 25,5	12,0 +/- 17,0
23.5.1	2,3 +/- 1,8	1,2 +/- 0,5	1,1 +/- 0,6	10,7 +/- 17,5	9,2 +/- 11,1
23.25.1	2,1 +/- 1,8	2,4 +/- 1,0	1,1 +/- 0,5	3,3 +/- 4,2	13,6 +/- 28,9
23.28.1	2,4 +/- 1,7	2,7 +/- 2,1	1,3 +/- 0,6	10,6 +/- 17,5	18,3 +/- 22,6
23.29.1	2,0 +/- 1,5	1,2 +/- 0,4	0,9 +/- 0,5	8,4 +/- 10,6	10,6 +/- 13,1
24.2.1	4,7 +/- 3,0	2,1 +/- 1,2	3,8 +/- 3,8	56,6 +/- 95,8	31,2 +/- 28,4

O Quadro 27 compara a regulação positiva de moléculas de superfície celular em células dendríticas sobre células B em termos da razão de as vezes de aumento médio em células dendríticas sobre as vezes de aumento médio em células B.

QUADRO 27

Regulação positiva de Moléculas de superfície celular em Células dendríticas versus células B				
	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	MHC Classe II	ICAM (CD54)
3.1.1	1,08	19,40	1,38	1,15
21.2.1	1,01	7,37	1,49	1,12

Regulação positiva de Moléculas de superfície celular em Células dendríticas versus células B				
	B7-1 (CD80)	B7-2 (CD86)	MHC Classe II	ICAM (CD54)
21.4.1	0,77	7,04	1,37	0,74
22.1.1	1,18	16,36	1,61	1,44
23.5.1	0,83	10,54	1,59	1,06
23.25.1	0,66	2,57	0,85	0,98
23.28.1	0,71	10,81	2,16	2,57
23.29.1	0,73	9,07	1,66	1,23
24.2.1	3,48	52,30	2,64	1,35

EXEMPLO VIII

Aumento de Secreção de citocina

Realizou-se um ensaio de célula dendrítica derivada de monócito para determinar se os anticorpos anti-CD40 humanos da invenção potenciam a secreção de IL-12p40, IL-12p70 e IL-8.

As células dendríticas derivadas de monócito e os monócitos aderentes foram preparados como descrito acima. As células foram cultivadas na presença de um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) ou com um anticorpo de anti-hemocianina de molusco keyhole (KLH) como um controlo negativo. As citocinas foram medidas nos sobrenadantes a 24 horas por meio de ELISA (R&D Systems). Em alguns estudos (veja-se Quadro 28), as células dendríticas derivadas de monócito tratadas com o anticorpo também foram co-estimuladas com 100 ng/ml de LPS (Sigma), 1000 U/ml de IFN γ (R&D Systems) ou 25 ng/ml de IL-1 β R&D Systems.

O anticorpo anti-CD40 aumentou a produção IL-12p40, IL-12p70 e IL-8 tanto em células dendríticas derivadas de monócito como em monócitos aderentes. A presença de LPS ainda aumentou a produção de IL-12p40 e IL-12p70. Somente níveis mínimos de citocinas foram detectados nos sobrenadantes de células dendríticas incubados com o

anticorpo de isotipo de controlo, anti-KLH. Os resultados representativos são apresentados no Quadro 28 e nas Figuras 3 e 4. O Quadro 28 resume as principais citocinas produzidas por células dendríticas ou monócitos aderentes em 1 µg/ml de um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) +/- 100 ng/ml LPS. Como mostrado na Figura 3, o anticorpo anti-CD40 aumentou produção de IL-12p40 pelas células dendríticas humanas. A Figura 4 ilustra a produção aumentada de IL-12p70 pelas células dendríticas humanas na presença de anticorpo e 100 ng/ml de LPS.

QUADRO 28

Aumento de Secreção de IL-12p40, IL-12p70 e IL-8 por um Anticorpo anti-CD40 da invenção					
	Tratamento		Citocina induzida		
Tipo de célula	Anticorpo 1 µg/ml	LPS 100 ng/ml	IL-12p40 µg/ml	IL-12p70 µg/ml	IL-8 µg/ml
Célula dendrítica	21.4.1	+	32252	1000	ND
	21.4.1	-	1200	76	1200
	anti-KLH	+	14280	352	ND
	anti-KLH	-	200	4	150
Monócito aderente	21.4.1	-	ND	ND	7000
	21.4.1	+	ND	425	ND
	anti-KLH	-	ND	ND	400
	anti-KLH	+	ND	30	ND

ND = não determinado

Experiências similares foram realizadas usando múltiplos anticorpos anti-CD40 da invenção. As células dendríticas derivadas de monócito foram preparadas como descrito acima e cultivadas na presença de várias concentrações dos anticorpos anti-CD40 e foram co-estimuladas com 100 ng/ml LPS (Sigma). O IL-12p70 em the sobrenadante foi medido a 24 horas por meio de ELISA (R&D Systems) e a EC₅₀ para cada anticorpo foi determinada. Os resultados das experiências são apresentados no Quadro 29.

QUADRO 29

Aumento de Secreção de IL-12p70 <u>Em Células dendríticas</u>		
Clone Anticorpo	de	DC IL-12p70
		<u>EC₅₀</u> µg/ml <u>Max</u> pg/ml
21.4.1	0,3	1796-7004
22.1.1	0,1	720-1040
23.25.1	0,2	540-960
23.5.1	0,1	676-1112
24.2.1	0,2	754-3680
3.1.1	0,2	668-960
23.28.1	0,2	1332-1404
23.29.1	0,1	852-900
21.2.1	0,03	656-872

Também se testou a capacidade dos anticorpos anti-CD40 da invenção para aumentar a secreção de IFN-gama das células T num ensaio de célula dendrítica/célula T alogénica. Para realizar este ensaio, células T e monócitos foram isolados do sangue periférico de voluntários saudáveis. Os monócitos foram diferenciados em células dendríticas usando os métodos descritos acima. 1×10^5 células T obtidas a partir de um indivíduo foram cultivadas com 1×10^5 células dendríticas obtidas a partir de um indivíduo diferente na presença de um anticorpo anti-CD40 da invenção ou um anticorpo de controlo. Após 4 dias de cultura, os sobrenadantes foram ensaiados para secreção de IFN-gama por meio de ELISA. Os resultados deste ensaio são mostrados no Quadro 30.

QUADRO 30

Aumento de Secreção de IFN-gama <u>por anticorpos anti-CD40 da invenção</u>		
Clone Anticorpo	de	DC Alo/T IFN γ
		<u>EC₅₀</u> µg/ml <u>Max</u> pg/m
21.4.1	0,3	212
22.1.1	0,3	110-180
23.25.1	0,3	180-232
23.5.1	0,2	150-240
24.2.1	0,2	111-194

Aumento de Secreção de IFN-gama por anticorpos anti-CD40 da invenção		
Clone de Anticorpo	DC Alo/T IFN γ	
	EC ₅₀ μ g/ml	Max pg/m
3.1.1	0,1	100-195
23.28.1	0,2	120-190
23.29.1	0,3	134-150
21.2.1	0,03	230-256

EXEMPLO IX

Indução de Inflamatório Citocinas pelos anticorpos anti-CD40 da invenção

Os anticorpos 10.8.3, 15.1.1, 21.4.1 e 3.1.1 foram testados num ensaio de libertação de citocina de sangue completo descrito por Wing et al., Therapeutic. Immunol. 2:183-90 (1995) para determinar se inflamatório citocinas são induzido pelos anticorpos a concentração de 1, 10 e 100 μ g/ml. Nenhuma libertação significativa de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , ou IL-6 foi observada com estes anticorpos nas concentrações indicadas em sangue de 10 dadores normais.

EXEMPLO X

Aumento de Imunogenicidade de Linha celular Jy por Anticorpos Anti-CD40

As células JIYOYE CD40 positivas (ATCC CCL 87) ("células Jy") foram cultivadas e mantidas em meio RPMI. As células JIYOYE foram incubadas durante 24 horas com um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1), ou com um anticorpo de isotipo correspondido (anti-KLH), em meio RPMI completo. As células foram então lavadas e tratadas com 25 mg de mitomicina C (Sigma) / 7 ml de meios durante 60 min. Estas células foram então incubadas com células T humanas isoladas numa razão 1:100 durante 6 dias a 37 °C (5 % de CO₂). As células T foram então colhidas, lavadas, e o nível de actividade de CTL determinado contra crómio 51 fresco (New England Nuclear, Boston, MA) células JIYOYE marcadas. Actividade específica de CTL foi calculada como % citólise específica = (citólise Jy (cpm) - citólise espontânea

(cpm))/(total citólise (cpm) - citólise espontânea (cpm)).

Como a Figura 5 ilustra, um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1) aumentou significativamente a imunogenecidade contra células Jy tratadas com o anticorpo.

EXEMPLO XI

Modelo animal de tumor

Para investigar adicionalmente a actividade anti-tumoral dos anticorpos anti-CD40 feitos de acordo com a invenção, um modelo de ratinho SCID-bege foi projectado para testar o efeito *in vivo* do anticorpo sobre o crescimento tumoral.

Obteve-se ratinhos bege SCID de Charles River e permitiu-se que os ratinhos se aclimassem uma semana antes da utilização. As células tumorais (células Daudi (ATCC CCL 213), células K562 CD40(-) (ATCC CCL 243) e células Raji CD40(+) (ATCC CCL 86), células de cancro de mama BT474 (ATCC HTB 20) ou células de próstata PC-3 (ATCC CRL 1435)) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Em alguns casos, as células T (5×10^5) e células dendríticas (1×10^5) do mesmo dador humano juntamente com as células tumorais foram injectadas. Também se injectou um anticorpo anti-CD40 da invenção, ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). Em seguida mediu-se o crescimento tumoral. Experiências específicas são descritas a seguir.

Numa experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1), ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, numa dose de 10 mg/kg imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). As células tumorais (células Daudi) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. O crescimento tumoral foi medido com calibradores nos dias 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27 e 28 após

a implantação na presença de células T humanas e células dendríticas. Como mostrado na Figura 6, o anticorpo anti-CD40 inibiu o crescimento tumoral em cerca de [60] %.

Em outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1), ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, numa dose de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg ou 10 mg/kg imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). As células tumorais (K562 células) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Nesta experiência injectou-se células T (5×10^5) e células dendríticas (1×10^5) do mesmo dador humano juntamente com as células tumorais. O crescimento tumoral foi medido com calibradores nos dias 17, 19, 20, 21, 25, 26, 27 e 28 após a implantação. Como mostrado na Figura 7, o anticorpo anti-CD40 inibiu o crescimento tumoral em 60-85 %.

Em outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1, 23.29.1 ou 3.1.1), ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). O anticorpo de controlo de isotipo correspondido e anticorpo 21.4.1 foram injectados numa dose de 1 mg/ml. Os anticorpos 23.29.1 e 3.1.1 foram injectados numa dose de 1, 0,1, 0,01, 0,001 ou 0,0001 mg/kg. As células tumorais (células K562) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Nesta experiência injectou-se células T (5×10^5) e células dendríticas (1×10^5) do mesmo dador humano juntamente com as células tumorais. Em seguida mediu-se crescimento tumoral com calibradores no dia 28 após a implantação. Os resultados desta experiência são mostrados nas Figuras 8 e 9. Cada ponto nas Figuras representa uma medição de um único animal.

Em outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1), ou um controlo de isotipo

correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). Os anticorpos foram injectados numa dose de 1, 0,1, 0,01, 0,001 ou 0,0001 mg/kg. As células tumorais (células Raji) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Em alguns animais, injectou-se células T (5×10^5) e células dendríticas (1×10^5) do mesmo dador humano juntamente com as células tumorais. Em seguida mediu-se crescimento tumoral com calibradores no dia 28 após a implantação. Os resultados desta experiência são mostrados na Figura 10. Cada ponto na Figura representa uma medição de um único animal.

Em ainda outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1, 23.28.1, 3.1.1 ou 23.5.1), ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). Os anticorpos foram injectados numa dose de 1 ou 0,1 mg/kg. As células tumorais (células Raji) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Em seguida mediu-se crescimento tumoral com calibradores no dia 28 após a implantação. Os resultados desta experiência são mostrados na Figura 11. Cada ponto na Figura representa uma medição de um único animal.

Em ainda outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (21.4.1, 23.29.1, ou 3.1.1), ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). Os anticorpos foram injectados numa dose de 1 mg/kg. As células tumorais (BT474 células de cancro de mama) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Injectou-se células T (5×10^5) e células dendríticas (1×10^5) do mesmo dador humano juntamente com as células tumorais. Em seguida mediu-se crescimento tumoral com calibradores no

dia 39 após a implantação. Como mostrado na Figura 12, todos os anticorpos inibiram o crescimento tumoral de cancro de mama. Cada ponto na Figura representa uma medição de um único animal.

Em ainda outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção (3.1.1), ou um controlo de isotipo correspondido (anti-KLH), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor (uma injeção somente). Os anticorpos foram injectados numa dose de 1 mg/kg. As células tumorais (PC-3 células de próstata tumorais) foram injectadas subcutaneamente numa concentração de 1×10^7 células/animal. Em seguida mediu-se crescimento tumoral com calibradores no dia 41 após a implantação. Como mostrado na Figura 13, o anticorpo anti-CD40 inibiu o crescimento de tumor de próstata em cerca de 60 %. Cada ponto na Figura representa uma medição de um único animal.

EXEMPLO XII

Sobrevivência de Ratinhos SCID-Bege Injectados com Células Tumorais Daudi E Tratados Com Os anticorpos Anti-CD40 da Invenção

Em outra experiência, injectou-se um anticorpo anti-CD40 da invenção, ou um controlo de isotipo correspondido (uma injeção), intraperitonealmente, imediatamente antes da injeção de tumor. Os anticorpos foram injectados numa dose de 1 ou 0,1 mg/kg. As células tumorais (células Daudi) foram injectadas intravenosamente numa dose de 5×10^6 células/animal. Então a sobrevivência do animal foi monitorizada. Como mostrado na Figura 14, todos os anticorpos anti-CD40 testados prolongaram a sobrevivência de ratinhos injectados com tumores em pelo menos seis dias.

O Quadro 31 lista o ED₅₀ dos anticorpos anti-CD40 nos diferentes modelos de tumor sólido descritos no Exemplo XI. O Quadro 31 resume a actividade anti-tumoral *in vivo* de alguns dos anticorpos anti-CD40 da invenção em ratinhos

SCID. Além disso, o quadro lista o ED₅₀ dos anticorpos anti-CD40 no modelo de tumor sistêmico Daudi descrito acima no Exemplo XII.

QUADRO 31

ED ₅₀ de Anticorpos anti-CD40 da invenção Usando Diferentes de Modelos de Tumor <i>In vivo</i> em ratinhos SCID				
Anticorpo	CD40 (-) K562 & T/DC <i>sub-cutâneo</i> (mg/kg)	CD40 (+) Raji T/DC <i>sub-cutâneo</i> (mg/kg)	CD40 (+) & Raji <i>sub-cutâneo</i> (mg/kg)	CD40 (+) Daudi <i>intra-venoso</i> (mg/kg)
21.4.1	0,005	0,0008	0,016	0,1
22.1.1	0,01	ND	> 1,0	0,1
23.25.1	≥ 1,0	ND	> 1,0	ND
23.5.1	> 1,0	ND	≥ 1,0	ND
24.2.1	> 1,0	ND	> 1,0	ND
3.1.1	0,02	ND	≥ 0,1	≤ 0,1
23.28.1	> 1,0	ND	≥ 1,0	0,1
23.29.1	0,009	ND	> 1,0	≤ 0,1
21.2.1	≤ 1,0	ND	ND	ND

ND = Não Determinado

EXEMPLO XIII

Determinação de Constantes de Afinidade (K_D) de Anticorpos anti-CD40 Completamente humanos por BIAcore

Medições de afinidade foram realizadas de anticorpos purificados por ressonância de plasmão de superfície usando o instrumento BIAcore 3000, seguindo os protocolos do fabricante.

O instrumento de análise de interação bioespecífica de Biosensor (BIAcore) utiliza ressonância de plasmão de superfície para medir as interações moleculares num chip sensor CM5. As mudanças nos índices refractivos entre duas médias, vidro e dextrano carboximetilado, causadas pela interação de moléculas ao lado do dextrano do chip sensor, são medidas e relatadas como mudanças em unidades de reflectância arbitrária (RU) como pormenorizado nas notas de aplicação do fabricante.

A superfície de dextrano carboximetilado de uma célula

de fluxo num chip sensor foi activada pela derivatização com 0,05 M N-hidroxisuccinimida mediado em 0,2 M N-etil-N'-(dimetilaminopropil) carbodiimida durante 7 min. A proteína de fusão CD40-Ig (descrito no Exemplo I) numa concentração de 5 µg/ml, em 10 mM de acetato de Na, pH 3,5, foi manualmente injectada na célula de fluxo numa taxa de 5 µl/min e covalentemente imobilizada à superfície da célula de fluxo com a quantidade desejada de RU's.

A desactivação de ésteres de N-hidroxisuccinimida não reagidos foi realizada usando cloridrato de etanolamina a 1 M, pH 8,5. Após a imobilização, as células de fluxo são limpas de qualquer material não reagido ou pobremente ligado com 5 injeções de regeneração de 5 µl de 50 mM de NaOH até uma linha de base estável ser alcançada. A célula de fluxo 2, uma superfície de densidade alta, mediu aproximadamente 300 RU's após a preparação da superfície e célula de fluxo 3, uma superfície de densidade baixa, mediu aproximadamente 150 RU's. Para a célula de fluxo 1, a superfície de controlo activado, 35 ml de tampão de acetato de Na a 10 mM foram injectados durante a imobilização no lugar de antígeno. A célula de fluxo 4 continha aproximadamente 450 RU's de CTLA4-Ig imobilizada, um controlo de antígeno irrelevante.

Uma série de diluição de cada anticorpo foi preparada no intervalo de concentração de 100 µg/ml até 0,1 µg/ml em meio logs. A taxa de fluxo foi ajustada a 5 µl/min e 25 µl de cada amostra de ponto de concentração foram injectados sobre o chip sensor com uma injeção de regeneração de 5 µl de NaOH a 50 mM entre cada concentração de anticorpo injectado. Os dados foram analisados usando software BIAevaluation 3.0.

Em experiências cinéticas de orientação reversa, o anticorpo 21.4.1 foi imobilizado à superfície do chip sensor usando o protocolo descrito acima. Anti-KLH foi usado como uma superfície de anticorpo de controlo. O

antigénio, proteína de fusão CD40-Ig, foi injectado no intervalo de concentração de 100 µg/ml até 0,1 µg/ml.

O Quadro 32 lista medições de afinidade para anticorpos anti-CD40 representativos da presente invenção:

QUADRO 32

Medições de afinidade para Anticorpos anti-CD40 da invenção			
Anticorpo	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
3.1.1	$1,12 \times 10^6$	$3,31 \times 10^{-5}$	$3,95 \times 10^{-11}$
10.8.3	$2,22 \times 10^5$	$4,48 \times 10^{-7}$	$2,23 \times 10^{-12}$
15.1.1	$8,30 \times 10^4$	$2,83 \times 10^{-7}$	$4,05 \times 10^{-12}$
21.4.1	$8,26 \times 10^4$	$2,23 \times 10^{-5}$	$3,48 \times 10^{-10}$
22.1.1	$9,55 \times 10^5$	$1,55 \times 10^{-4}$	$2,79 \times 10^{-10}$
23.25.1	$3,83 \times 10^5$	$1,65 \times 10^{-7}$	$7,78 \times 10^{-12}$
23.28.1	$7,30 \times 10^5$	$8,11 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-10}$
23.29.1	$3,54 \times 10^5$	$3,90 \times 10^{-5}$	$7,04 \times 10^{-11}$

EXEMPLO XIV

Mapeamento de Epítomos dos Anticorpos Anti-CD40

Os ensaios de ligação foram feitos usando antigénio de fusão CD40 humano-IgG1 Fc de Proteína A purificado. A proteína de fusão CD40 humano-IgG1 Fc foi clonada em Pfizer. A proteína de fusão CD40 humano IgG1 foi expressa numa linha de células de mamíferos e purificada através de coluna de Proteína A. A pureza do antigénio de fusão foi avaliada por SDS/PAGE.

O CD40 tem uma estrutura de uma proteína transmembrana do tipo I típica. A molécula madura é composta de 277 aminoácidos. O domínio extracelular de CD40 consiste em quatro domínios ricos em cisteína do tipo TNFR. Veja-se, por exemplo, Neismith e Sprang, TIBS 23:74-79 (1998); van Kooten e Banchereau, J. Leukocyte Biol. 67:2-17 (2000); Stamenkovic *et al.*, EMBO J. 8:1403-1410 (1989).

Ligação dos Anticorpos Anti-CD40 a CD40 humano Reduzido e Não Reduzido:

Por causa do domínio extracelular de CD40 consistir em quatro domínios ricos em cisteína, a disrupção das ligações intramoleculares, por redução do agente, pode alterar a reactividade do anticorpo. Para determinar se a disrupção das ligações intramoleculares, por redução do agente, alterou a reactividade de anticorpos anti-CD40 seleccionados da invenção, CD40-hIgG purificado foi carregado em SDS/PAGE (4-20 % gel) sob condições não redutoras (NR), ou redutoras (R). SDS/PAGE foi realizado pelo método de Laemmli, usando um sistema mini-gel. As proteínas separadas foram transferidas à membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas usando PBS contendo 5 % (p/v) de leite seco não gordo durante pelo menos 1 hora antes do desenvolvimento, e submetidas a sondagem durante 1 h com cada anticorpo. Os anticorpos anti-CD40 foram detectados usando imunoglobulinas anti-humanas de cabra conjugadas com HRP (diluição 1:8.000; N° de Catálogo A-8667 de Sigma). As membranas foram desenvolvidas usando Quimiluminescência aumentada (ECL®; Amersham Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante.

O Western Blot foi então submetido a sonda com quatro anticorpos anti-CD40 da invenção: 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 (1 mg/ml,) seguido por IgG anti-humana de cabra conjugada com HRP (1:8000 diluição). Os resultados desta experiência são mostrados na Figura 15. Os resultados indicam que os anticorpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 se ligam a CD40 não reduzido, mas não se ligam a reduzido, os anticorpos, assim, reconhecem um epítipo conformacional.

Ligação dos anticorpos anti-CD40 a Proteínas de Domínio Deletado de CD40 humano:

A região extracelular de CD40 inclui quatro domínios repetidos do tipo TNFR (denominados como D1-D4). Veja-se, por exemplo, Neismith e Sprang, TIBS 23:74-79 (1998); van Kooten e Banchereau, J. Leukocyte Biol. 67:2-17 (2000);

Stamenkovic *et al.*, EMBO J. 8:1403-1410(1989). A Figura 16 mostra as sequências de aminoácidos dos domínios CD40 de ratinho e humano D1-D4. Para investigar a contribuição de diferentes regiões da molécula de CD40 na apresentação do epítipo, um número de mutantes de domínio deletado foram construídos.

Para preparar as construções de deleção de CD40 humano, o domínio extracelular de CD40 humano inteiro (aminoácidos 1-193) foi amplificado a partir de ADNc de células B humanas (CD19+) (Multiple tissue cDNA panels, N° de Catálogo K1428-1, de Clontech) por PCR usando iniciadores de sequência específicos, e uma cauda de 6XHis foi adicionada ao C-terminal. Um iniciador 5' de CD40 humano 5'-GCAAGCTTCACCAATGGT TCGTCTGCCTCTGCAGTG-3' (SEQ ID NO: 135) foi usado com combinação diferente de iniciadores 3' para a clonagem de comprimento completo e moléculas de CD40 truncadas. O iniciador 3' para a clonagem do domínio extracelular de CD40 humano de comprimento total foi: 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGTCTCAGCCGAT CCTGGGGACCA-3' (SEQ ID NO: 136). O iniciador 3' usado para clonar os domínios D1-D3 de CD40 humano foi: 5'-TCAGTGATGGTGATGGT-GATGTGGGCA GGGCTCGCGATGGTAT-3' (SEQ ID NO: 137) O iniciador 3' usado para clonar os domínios de CD40 D1-D2 foi: 5'-TCAGTGATGGTGATGGTGATGA CAGGTGCAGATGGTGTCTGTT-3' (SEQ ID NO: 138). Após estas construções de ADNc de CD40 truncado terem sido geradas, foram expressas na linha de células 293F usando o vector pCR3.1 (Invitrogen). As proteínas de fusão CD40-6XHis foram purificadas por eluição de uma coluna de níquel.

As sequências de aminoácidos destes quatro mutantes de deleção são mostradas no Quadro 33.

QUADRO 33

Proteínas de fusão CD40 His-Tag	
Mutante de Deleção:	Sequência de aminoácidos (sequência líder sublinhada)
CD40 humano-6XHis (domínio extracelular de comprimento completo)	<u>MVRLPLOCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS</u> QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQKGT SETDTICTCEEHWHCTSEACESCVLHRS CSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEK CHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVC GPQDRHHHHHH (SEQ ID NO: 139) .
CD40 humano (D1-D3)-6xHis	<u>MVRLPLOCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS</u> QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQKGT SETDTICTCEEHWHCTSEACESCVLHRS CSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPHHHHHH (SEQ ID NO: 140)
CD40 humano (D1-D2)-6Xhis	<u>MVRLPLOCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINS</u> QCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC GESEFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQKGT SETDTICTCHHHHHH (SEQ ID NO: 141)

Para expressar estas construções de deleção de CD40 humano, as construções foram clonadas no vector pCR3.1 (Invitrogen) e a expressão foi avaliada em várias linhas de células 293F estáveis e transientemente transfectadas. Os sobrenadantes das células 293F transientemente transfectadas foram analisados para a ligação a anticorpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 por meio de ELISA e Western Blot.

Os ensaios ELISA foram realizados usando sobrenadante de células 293F transfectadas com diferentes construções de CD40. As placas de ELISA foram revestidas com anticorpos policlonais anti-CD40 humano de cabra (R&D N° de Catálogo AF 632) ou anticorpos policlonais de CD40 anti-ratinho de cabra (R&D N° de Catálogo AF 440) diluídos até 1 µg/ml em tampão de revestimento de placa de ELISA. A expressão de construções de CD40 em células 293F foi confirmada por detecção com anticorpo anti-CD40 humano de cabra biotinilado (R&D N° de Catálogo BAF 632), anti-ratinho CD40

de cabra (R&D N° de Catálogo BAF 440), ou anti-His conjugado com HRP (C terminal) (Invitrogen, N° de Catálogo 46-0707). A ligação de anticorpos anti-CD40 humanos foi detectada com IgG anti-humano de cabra conjugada com HRP (Caltag específico a FC H10507), diluído 1:2.000. Os resultados, como mostrado no Quadro 34, indicam que a maior parte se não todo o epítipo reconhecido pelos mAbs 21.4.1, 23.28.1 e 23.29.1 está localizado na região D1-D2 de CD40 enquanto o epítipo para o mAb 24.2.1 está localizado pelo menos parcialmente em domínio D3-D4. Uma proteína de fusão de CD40 humano - Fc de coelho foi usada como um controle para confirmar a especificidade de ligação a anticorpo.

QUADRO 34

ELISA: Ligação de Anticorpo a Mutantes de Deleção CD40			
	CD40 (D1-D2)-6Xhis humano	CD40 (D1-D3)-6XHis humano	CD40-6XHis humano
21.4.1	+	+	+
23.25.1	+	+	+
	CD40 humano (D1-D2)-6Xhis	CD40 humano (D1-D3)-6XHis	CD40 humano-6XHis
23.29.1	+	+	+
24.2.1	-	+	+
anti-His	+	+	+
anti-RbIg	ND	ND	ND

As construções de deleção de CD40 também foram analisadas por análise de Western Blot. Os resultados são mostrados no Quadro 35. Os resultados de ELISA mostram que o local de ligação dos anticorpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 envolve os domínios D1-D3. Os resultados também mostram que o local de ligação para os anticorpos 21.4.1, 23.25.1 e 23.29.1 envolve os domínios D1-D2, e que o local de ligação de anticorpo 24.2.1 envolve o domínio D3.

QUADRO 35

Western Blot: Ligação de Anticorpo a Mutantes de Deleção CD40		
	CD40 (D1-D3)- 6Xhis humano	CD40 -6Xhis humano
21.4.1	+	+
23.25.1	+	+
23.29.1	+	+
24.2.1	+	+
anti-His	+	+
Anti-RbIg	ND	ND

Ligação dos Anticorpos Anti-CD40 a Ratinho CD40:

A determinação da capacidade dos anticorpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 de ligarem-se a CD40 de ratinho foi iniciada.

Para esta experiência, CD40 de ratinho foi amplificado de ADNc de células B de ratinho. A proteína de fusão de CD40 de ratinho(D1-D3)-6xHis foi clonada em pCR3.1, que utiliza o promotor CMV, para conduzir a transcrição. O iniciador 5' usado para clonar o domínio extracelular do CD40 de ratinho foi: 5'-TGCAAGCTTCACCATGGTGTCTTTGCCTCGGCTGTG-3'. O iniciador 3' usado para clonar os domínios D1 - D3 de CD40 de ratinho foi: 5'-GTCCTCGAGTCAGTGATGGTGATGGTGATGT-GGGCAGGGATGACAGAC-3'. As construções de ADNc de ratinho e humanas foram transfectadas em células 293F transientemente. A expressão de CD40 recombinante foi detectada por meio de ELISA usando anticorpos policlonais contra CD40 de ratinho e humano, anticorpos anti-His, e anticorpos anti-CD40 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1. Os resultados destas experiências são mostrados no Quadro 36. Esta experiência mostra que todos os anticorpos são específicos para CD40 humano e não reagem de maneira cruzada com CD40 de ratinho.

QUADRO 36

Reactividade cruzada de Ratinho e CD40 humano		
	CD40 (D1-D3)-6Xhis de Ratinho	CD40 (D1-D3)- 6XHis humano
21.4.1	Não	Sim
23.25.1	Não	Sim
23.29.1	Não	Sim
24.2.1	Não	Sim
anti-CD40 humano de cabra	Não	Sim
anti- CD40 de ratinho de cabra	Sim	Não
Anti-His	Sim	Sim

Ligação dos anticorpos anti-CD40 a CD40 Quimérico Humano/de Ratinho:

Devido a que os anticorpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 não se ligam a CD40 de ratinho, construiu-se proteínas CD40 quiméricas humanas/de ratinho para mapear mais definitivamente os epítomos daqueles anticorpos.

Para a construção de fusões na grelha das proteínas quiméricas de CD40 humano e murino, usou-se locais de restrição únicos nos limites dos domínios de CD40 nas posições idênticas no ADNc de ambos CD40 humano e de ratinho. Várias construções de ADNc de CD40 foram geradas usando o local de restrição EcoRI no final do domínio 1 (nucleótido 244, aminoácido 64) e o local de restrição BanI no final de domínio 2 (nucleótido 330, aminoácido 94) (Figura 17).

Vários domínios de CD40 foram amplificados por PCR e ligados. Esta abordagem permitiu a substituição de vários domínios do CD40 de ratinho pelos domínios homólogos do CD40 humano. As construções obtidas são mostradas na Figura 18.

Determinou-se então se os anticorpos 21.4.1, 23.25.1, 23.29.1 e 24.2.1 foram capazes de ligar-se às proteínas

quiméricas de CD40 de ratinho/humano por meio de ELISA. Os resultados desta experiência são mostrados no Quadro 37. Como mostrado no Quadro 37, mAbs 21.4.1 e 23.25.1 reconhecem um epítopo que está localizado parcialmente em D1 e parcialmente em D2; mAb 23.29.1 reconhece um epítopo localizado na sua maior parte se não completamente em D2; e mAb 24.2.1 reconhece um epítopo localizado em D2 e D3.

QUADRO 37

Ligação de Anticorpo a Proteínas de CD40 quiméricas						
Anticorpo	HuD1	HuD2	HuD3	HuD1, D2	HuD2, D3	HuD1, D3
21.4.1	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
23.25.1	Não	Não	Não	Sim	Não	Não
23.29.1	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não
24.2.1	Não	Não	Não	Não	Sim	Não

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para a conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento de Patente Europeia. Embora tenha sido tomado muito cuidado na compilação das referências, não se poderão excluir erros e omissões e o IEP não assume qualquer responsabilidade neste sentido.

Documentos de Patente citados na descrição

- US 5151510 A [0080]
- US 5916771 A [0134]
- US 5939598 A [0134]
- US 5985615 A [0134]
- US 5998209 A [0134]
- US 6075181 A [0134]
- US 6091001 A [0134]
- US 6114598 A [0134]
- US 6130364 A [0134]
- US 6162963 A [0134]
- US 6150584 A [0134]
- WO 9110741 A [0134]
- WO 9402602 A [0134]
- WO 9634096 A [0134]
- WO 9633735 A [0134]
- WO 9816654 A [0134]
- WO 9824893 A [0134] [0136] [0255]
- WO 9850433 A [0134]
- WO 9945031 A [0134]
- WO 9953049 A [0134]
- WO 0009560 A [0134] [0188]
- WO 001037504 A [0134]
- US 5994619 A [0135] [0141]
- US 5545807 A [0137]
- US 5545806 A [0137]
- US 5569825 A [0137]

- US 5625126 A [0137]
- US 5633425 A [0137]
- US 5661016 A [0137]
- US 5770429 A [0137]
- US 5789650 A [0137]
- US 5814318 A [0137]
- US 5591669 A [0137]
- US 5612205 A [0137]
- US 5721367 A [0137]
- US 5789215 A [0137]
- US 5643763 A [0137]
- WO 0037504 A [0144]
- US 5168062 A [0172]
- US 4510245 A [0172]
- US 4968615 A [0172]
- US 6517529 B [0172]
- US 4399216 A [0173] [0174]
- US 4634665 A [0173]
- US 5179017 A [0173]
- US 4912040 A [0174]
- US 4740461 A [0174]
- US 4959455 A [0174]
- EP 0216846 A [0176]
- EP 0256055 A [0176]
- EP 0323997 A [0176]
- EP 89303964 A [0176]
- US 5827690 A [0178]
- US 5756687 A [0178]
- US 5750172 A [0178]
- US 5741957 A [0178]
- US 6046037 A [0178]
- US 5959177 A [0178]
- US 6417429 B [0179]
- US 5223409 A [0181]
- WO 9218619 A [0181]

- WO 9117271 A [0181]
- WO 9220791 A [0181]
- WO 9215679 A [0181]
- WO 9301288 A [0181]
- WO 9201047 A [0181] [0182]
- WO 9209690 A [0181]
- WO 9306213 A [0182]
- WO 9852976 A [0186]
- WO 0034317 A [0186]
- WO 9633172 A [0216]
- WO 9627583 A [0216]
- EP 97304971 A [0216]
- EP 99308617 A [0216]
- WO 9807697 A [0216]
- WO 9803516 A [0216]
- WO 9834918 A [0216]
- WO 9834915 A [0216]
- WO 9833768 A [0216]
- WO 9830566 A [0216]
- EP 606046 A [0216]
- EP 931788 A [0216]
- WO 9005719 A [0216]
- WO 9952910 A [0216]
- WO 9952889 A [0216]
- WO 9929667 A [0216]
- WO 9801113 W [0216]
- EP 99302232 A [0216]
- GB 9912961 A [0216]
- US 601148464 A [0216]
- US 5863949 A [0216]
- US 5861510 A [0216]
- EP 780386 A [0216]
- WO 9519970 A [0217] [0218]
- WO 9814451 A [0217]
- WO 9802434 A [0217] [0218]

- US 5747498 A [0217]
- WO 9924440 A [0218]
- WO 9900797 W [0218]
- WO 9521613 A [0218]
- WO 9961422 A [0218]
- US 5834504 A [0218]
- WO 9850356 A [0218]
- US 5883113 A [0218]
- US 5886020 A [0218]
- US 5792783 A [0218]
- WO 9910349 A [0218]
- WO 9732856 A [0218]
- WO 9722596 A [0218]
- WO 9854093 A [0218]
- WO 9802438 A [0218]
- WO 9916755 A [0218]
- WO 9802437 A [0218]
- WO 9935146 A [0218]
- WO 9935132 A [0218]
- WO 9713760 A [0218]
- US 5587458 A [0218]
- US 5877305 A [0218]
- US 60117341 B [0218]
- US 60117346 B [0218]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição:

- **STAMENKOVIC et al.** *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1403-10 [0001]
- **PAULIE S. et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1985, vol. 20, 23-8 [0001]
- **BANCHEREAU J. et al.** *Adv. Exp. Med. & Biol.*, 1995, vol. 378, 79-83 [0001]
- **ALDERSON M.R. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1993, vol. 178, 669-74 [0001]

- **RUGGIERO G. et al.** *J. of Immunol.*, 1996, vol. 156, 3737-46 [0001]
- **HOLLENBAUGH D. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1995, vol. 182, 33-40 [0001]
- **YELLIN M.J. et al.** *J. of Leukocyte Biol.*, 1995, vol. 58, 209-16 [0001]
- **LAZAAR A.L. et al.** *J. of Immunol.*, 1998, vol. 161, 3120-7 [0001]
- **FOY T.M. et al.** *Ann. Rev. of Immunol.*, 1996, vol. 14, 591-617 [0003]
- **LEE H.H. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 1421-6 [0004]
- **PULLEN S.S. et al.** *Biochemistry*, 1998, vol. 37, 11836-45 [0004]
- **GRAMMAR A.C. et al.** *J. of Immunol.*, 1998, vol. 161, 1183-93 [0004]
- **ISHIDA T.K. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 9437-42 [0004]
- **PULLEN S.S. et al.** *J. of Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 14246-54 [0004]
- **TSUKAMOTO N. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 1234-9 [0004]
- **SUTHERLAND C.L. et al.** *J. of Immunol.*, 1999, vol. 162, 4720-30 [0004]
- **JEPPSON J.D. et al.** *J. of Immunol.*, 1998, vol. 161, 1738-42 [0004]
- **UEJIMA Y. et al.** *Int. Arch. of Allergy & Immunol.*, 1996, vol. 110, 225-32 [0004]
- **GRUSS H.J. et al.** *Blood*, 1994, vol. 84, 2305-14 [0004]
- **VON LEOPRECHTING A. et al.** *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 1287-94 [0004]
- **DENFELD RW. et al.** *Europ. J. of Immunol.*, 1996, vol. 26, 2329-34 [0004]
- **CELLA M. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1996, vol. 184, 747-52 [0004]

- **FERLIN W.G. et al.** *Europ. J. of Immunol.*, 1998, vol. 28, 525-31 [0004]
- **ARMANT M. et al.** *Europ. J. of Immunol.*, 1996, vol. 26, 1430-4 [0004]
- **KOCH F. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1996, vol. 184, 741-6 [0004]
- **SEGUIN R. ; L.H. KASPER.** *J. of Infect. Diseases*, 1999, vol. 179, 467-74 [0004]
- **CHAUSSABEL D. et al.** *Infection & Immunity*, 1999, vol. 67, 1929-34 [0004]
- **KUNIYOSHI J.S. et al.** *Cellular Immunol.*, 1999, vol. 193, 48-58 [0004]
- **MCDYER J.F. et al.** *J. of Immunol.*, 1999, vol. 162, 3711-7 [0004]
- **SCHANIEL C. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 451-63 [0004]
- **ALTENBURG A. et al.** *J. of Immunol.*, 1999, vol. 162, 4140-7 [0004]
- **DECKERS J.G. et al.** *J. of the Am. Society of Nephrology*, 1998, vol. 9, 1187-93 [0004]
- **SANTOS-ARGUMEDO L. et al.** *Cellular Immunol.*, 1994, vol. 156, 272-85 [0004]
- **LEE H.H. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1999, vol. 96, 1421-6 [0004]
- **GROSSON J. et al.** *Archives of Dermatol. Res.*, 1998, vol. 290, 325-30 [0004]
- **KATADA Y. et al.** *Europ. J. of Immunol.*, 1996, vol. 26, 192-200 [0004]
- **MAYUMI M. et al.** *J. of Allergy & Clin. Immunol.*, 1995, vol. 96, 1136-44 [0004]
- **FLORES-ROMO L. et al.** *Immunol.*, 1993, vol. 79, 445-51 [0004]
- **ROY M. et al.** *Europ. J. of Immunol.*, 1995, vol. 25, 596-603 [0004]
- **JONES K.W. ; C.J. HACKETT.** *Cellular Immunol.*, 1996,

vol. 174, 42-53 [0004]

- **CAUX C. et al.** *Journal of Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 1263-72 [0004]
- **KIENER P.A. et al.** *J. of Immunol.*, 1995, vol. 155, 4917-25 [0004]
- **GREWAL et al.** *Ann. Rev. of Immunol.*, 1998, vol. 16, 111-35 [0005]
- **MACKEY et al.** *J. of Leukocyte Biol.*, 1998, vol. 63, 418-28 [0005]
- **NOELLE R.J.** *Agents & Actions*, 1998, vol. 49, 17-22 [0005]
- **BENNETT et al.** *Nature*, 1998, vol. 393, 478-480 [0006]
- **GREWAL I.S. et al.** *Science*, 1996, vol. 273, 1864-7 [0006]
- **GREWAL I.S. et al.** *Nature*, 1995, vol. 378, 617-20 [0006]
- **BUHLMANN J.E. et al.** *Immunity*, 1995, vol. 2, 645-53 [0006]
- **FLORES-ROMO L. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1997, vol. 185, 341-9 [0006]
- **MACKEY M.F. et al.** *J. of Immunol.*, 1998, vol. 161, 2094-8 [0006]
- **BROSSART P. et al.** *Blood*, 1998, vol. 92, 4238-47 [0006]
- **CARBONE E. et al.** *J. of Exp. Med.*, 1997, vol. 185, 2053-60 [0006]
- **MARTIN-FONTECHA A. et al.** *J. of Immunol.*, 1999, vol. 162, 5910-6 [0006]
- **HUANG A.Y. et al.** *Ciba Foundation Symp.*, 1994, vol. 187, 229-44 [0007]
- **TOES R.E.M. et al.** *Seminars in Immunol.*, 1998, vol. 10, 443-8 [0007]
- **ALBERT M.L. et al.** *Nature*, 1998, vol. 392, 86-9 [0007]
- **BENNETT S.R et al.** *J. of Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 65-70 [0007]

- **TOES RE.M. et al.** *Seminars in Immunol.*, 1998, vol. 10, 443-8 [0008]
- **SOTOMAYOR E.M. et al.** *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, 780-787 [0008]
- **DIEHL L. et al.** *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, 774-9 [0008]
- **HIRANO A. et al.** *Blood*, 1999, vol. 93, 2999-3007 [0008]
- **FRENCH R.R. et al.** *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, 548-53 [0008]
- **TUTT A.L. et al.** *J. of Immunol.*, 1998, vol. 161, 3176-85 [0008]
- **FUNAKOSHI S. et al.** *J. of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunol.*, 1996, vol. 19, 93-101 [0008]
- **MACKEY M.F. et al.** *Cancer Research*, 1997, vol. 57, 2569-74 [0009]
- **DONEPUDI M. et al.** *Cancer Immunol. Immunother.*, 1999, vol. 48, 153-164 [0009]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0053]
- **AUSUBEL et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates, 1992 [0053]
- **HARLOW ; LANE.** *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990 [0053]
- **CREIGHTON, ED.** *Proteins, Structures and Molecular Principles*. W. H. Freeman and Company, 1984 [0061]
- *Introduction to Protein Structure*. Garland Publishing, 1991 [0061]
- **THORNTON et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 105 [0061]
- **FAUCHERE.** *J. Adv. Drug Res.*, 1986, vol. 15, 29 [0062]
- **VEBER ; FREIDINGER.** *TINS*, 1985, 392 [0062]
- **EVANS et al.** *J. Med. Chem.*, 1987, vol. 30, 1229 [0062]
- **RIZO; GIERASCH.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 387 [0062]

- Fundamental Immunology. Raven Press, 1989 [0063]
- **KABAT**. Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health, 1987 [0064]
- **CHOTHIA ; LESK**. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0064]
- **CHOTHIA et al.** *Nature*, 1989, vol. 342, 878-883 [0064]
- **WARD et al.** *Nature*, 1989, vol. 341, 544-546 [0066]
- **BIRD et al.** *Science*, 1998, vol. 242, 423-426 [0067]
- **HUSTON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 5879-5883 [0067] [0191]
- **HOLLIGER P. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0067]
- **POLJAK R. J. et al.** *Structure*, 1994, vol. 2, 1121-1123 [0067]
- **BOWIE et al.** *Science*, 1991, vol. 253, 164 [0072]
- **JONSSON U. et al.** *Ann. Biol. Clin.*, 1993, vol. 51, 19-26 [0073]
- **JONSSON U. et al.** *Biotechniques*, 1991, vol. 11, 620-627 [0073]
- **JONSSON B. et al.** *J. Mol. Recognit.*, 1995, vol. 8, 125-131 [0073]
- **JOHNSON B. et al.** *Anal. Biochem.*, 1991, vol. 198, 268-277 [0073]
- Immunology - A Synthesis. Sinauer Associates, 1991 [0076]
- **LAPLANCHE et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 9081 [0080]
- **STEC et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, vol. 106, 6077 [0080]
- **STEIN et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1988, vol. 16, 3209 [0080]
- **ZON et al.** *Anti-Cancer Drug Design*, 1991, vol. 6, 539 [0080]
- **ZON et al.** *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*. Oxford University Press, 1991, 87-108 [0080]

- **UHLMANN ; PEYMAN.** *Chemical Reviews*, 1990, vol. 90, 543
[0080]
- **PEARSON.** *Methods Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63-98
[0085] [0091]
- **PEARSON.** *Methods Mol. Biol.*, 2000, vol. 132, 185-219
[0085] [0091]
- **PEARSON.** *Methods Enzymol.*, 1996, vol. 266, 227-258
[0085]
- **PEARSON.** *J. Mol. Biol.*, 1998, vol. 276, 71-84 [0085]
- **PEARSON.** *Methods Mol. Biol.*, 1994, vol. 243, 307-31
[0089]
- **GONNET et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 1443-45 [0090]
- **ALTSCHUL et al.** *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, 403-410
[0091]
- **ALTSCHUL et al.** *NucleicAcids Res.*, 1997, vol. 25,
3389-402 [0091]
- **GREEN et al.** *Nature Genetics*, 1994, vol. 7, 13-21
[0134]
- **MENDEZ et al.** *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 146-156
[0136] [0255]
- **GREEN ; JAKOBOVITS.** *J. Exp. Med.*, 1998, vol. 188, 483-
495 [0136]
- **HARLOW ; LANE.** *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold
Spring Harbor Press, 1990 [0141]
- **KABAT et al.** *Sequences of Proteins of Immunological
Interest.* NIH Publ. No. 91-3242, 1991 [0166]
- **HOGAN et al.** *Manipulating the Mouse Embryo: A
Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, 1999
[0179]
- **JACKSON et al.** *Mouse Genetics and Transgenics: A
Practical Approach.* Oxford University Press, 2000
[0179]
- **PINKERT.** *Transgenic Animal Technology: A Laboratory
Handbook.* Academic Press, 1999 [0179]
- **FUCHS et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1370-1372

[0181]

- **HAY et al.** *Hum. Antibod. Hybridomas*, 1992, vol. 3, 81-85 [0181]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0181]
- **MCCAFFERTY et al.** *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0181] [0182] [0191]
- **GRIFFITHS et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0181]
- **HAWKINS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 226, 889-896 [0181]
- **CLACKSON et al.** *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0181]
- **GRAM et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3576-3580 [0181]
- **GARRAD et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 1373-1377 [0181]
- **HOOGENBOOM et al.** *Nuc. Acid Res.*, 1991, vol. 19, 4133-4137 [0181]
- **BARBAS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 7978-7982 [0181]
- **GRIFFITHS et al.** *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0182]
- **BIRD et al.** *Science*, 1988, vol. 242, 423-426 [0191]
- **ILL et al.** *Protein Eng.*, 1997, vol. 10, 949-57 [0192]
- **MARTIN et al.** *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 5303-9 [0192]
- **BOLLIGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0192]
- **TRAUNECKER et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0192]
- **TRAUNECKER et al.** *Int. J. Cancer*, 1992, vol. 7, 51-52 [0192]
- **SONGSIVILAI ; LACHMANN.** *Clin. Exp. Immunol.*, 1990, vol. 79, 315-321 [0193]
- **KOSTELNY et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 1547-1553 [0193]
- Sustained and controlled Release Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, Inc, 1978 [0207]

- **GALFRE ; MILSTEIN.** *Methods Enzymol.*, 1981, vol. 73, 3-46 [0248]
- **MARKS et al.** Oligonucleotide primers for polymerase chain reaction amplification of human immunoglobulin variable genes and design of family-specific oligonucleotide probes. *Eur. J. Immunol.*, 1991, vol. 21, 985-991 [0251]
- **TOMLINSON et al.** *MRC Centre for Protein Engineering* [0251]
- **WING et al.** *Therapeutic. Immunol.*, 1995, vol. 2, 183-90 [0293]
- **NEISMITH ; SPRANG.** *TIBS*, 1998, vol. 23, 74-79 [0314] [0317]
- **VAN KOOTEN ; BANCHEREAU.** *J. Leukocyte Biol.*, 2000, vol. 67, 2-17 [0314] [0317]
- **STAMENKOVIC et al.** *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1403-1410 [0314] [0317]

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal ou uma porção de ligação a antigénio do mesmo que se liga especificamente a e activa CD40 humano, em que o epítopo reconhecido pelo dito anticorpo ou porção não se sobrepõe ao local de ligação para o ligando de CD40, em que o dito anticorpo ou porção inibe o crescimento tumoral *in vivo*, e em que o dito anticorpo compreende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, em que:

(a) as sequências de aminoácidos da CDR1, CDR2, e CDR3 da dita cadeia pesada são aquelas de um domínio variável de cadeia pesada seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- i) o domínio variável de cadeia pesada de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);
- ii) um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42; e
- iii) um domínio variável de cadeia pesada codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 41; e

(b) as sequências de aminoácidos da CDR1, CDR2, e CDR3 da dita cadeia leve são aquelas de um domínio variável de cadeia leve seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- i) o domínio variável de cadeia leve de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);
- ii) um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44; e
- iii) um domínio variável de cadeia leve codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 43.

2. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que:

(a) a dita cadeia pesada compreende a sequência de

aminoácidos de um domínio variável de cadeia pesada seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- i) o domínio variável de cadeia pesada de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);
 - ii) um domínio variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42; e
 - iii) um domínio variável de cadeia pesada codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 41; e
- (b) a dita cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos de um domínio variável de cadeia leve seleccionado a partir do grupo que consiste em:
- i) o domínio variável de cadeia leve de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);
 - ii) um domínio variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44; e
 - iii) um domínio variável de cadeia leve codificado pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 43.

3. O anticorpo de acordo com a reivindicação 1, em que

(a) a dita cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

- i) a sequência de aminoácidos de cadeia pesada de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);
- ii) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 46, ou a dita sequência de aminoácidos que não possui a sequência sinal; e
- iii) a sequência de aminoácidos codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 45, ou a dita sequência de aminoácidos codificada que não possui a sequência sinal; e

(b) a dita cadeia leve compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

- i) a sequência de aminoácidos de cadeia leve de 21.4.1 (N° de Depósito de ATCC PTA-3605);
- ii) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 48, ou a dita sequência de aminoácidos que não possui a sequência sinal; e
- iii) a sequência de aminoácidos codificada pela sequência de nucleótidos da SEQ ID NO: 47, ou a dita sequência de aminoácidos codificada que não possui a sequência sinal.

4. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 da dita cadeia pesada e as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 da dita cadeia leve são as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 42 e as sequências de aminoácidos de CDR1, CDR2 e CDR3 da SEQ ID NO: 44, respectivamente.

5. O anticorpo ou porção de ligação a antigénio de acordo com a reivindicação 1, em que as sequências de aminoácidos do domínio variável de cadeia pesada da dita cadeia pesada e do domínio variável de cadeia leve da dita cadeia leve são a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 42 e a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 44, respectivamente.

6. Um anticorpo monoclonal que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 46 sem a sequência sinal e a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 48 sem a sequência sinal.

7. Um anticorpo monoclonal que é 21.4.1 (N° de Depósito de ATCC PTA-3605) ou um anticorpo com as mesmas sequências de aminoácidos que 21.4.1 (N° de Depósito de ATCC PTA-3605).

8. Um anticorpo monoclonal humano, quimérico ou humanizado ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo que se liga especificamente a e activa CD40 humano, em que o dito anticorpo ou porção inibe o crescimento tumoral *in vivo*, e em que o anticorpo ou porção de ligação a antígeno:

- (a) compete de maneira cruzada para a ligação a CD40 com o anticorpo 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605); ou
- (b) liga-se ao mesmo epítipo de CD40 que o anticorpo 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605).

9. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, em que o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno tem pelo menos uma propriedade seleccionada a partir do grupo que consiste em:

- (a) não se liga a células B de ratinho, rato, cão e/ou coelho;
- (b) liga-se a células B humanas, de cinomolgos e/ou rhesus;
- (c) tem uma selectividade para CD40 que é pelo menos 100 vezes maior que a sua selectividade para activador de receptor de factor nuclear K-B (RANK), 4-1BB (CD137), receptor-1 de factor de necrose tumoral (TNFR-1) e receptor-2 de factor de necrose tumoral (TNFR-2);
- (d) liga-se a CD40 com uma K_D de 4×10^{-10} M ou menos;
- (e) tem uma K_{off} para CD40 de $2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ou menos;
- (f) inibe o crescimento tumoral *in vivo* na presença de células T humanas e/ou células dendríticas humanas;
- (g) inibe o crescimento de tumores CD40-positivos na ausência de células imunes humanas;
- (h) aumenta a expressão de ICAM, MHC-II, B7-2, CD71, CD23 e/ou CD71 na superfície de células B humanas;
- (i) aumenta a secreção de IL-12p40, IL-12p70 e/ou IL-8 pelas células dendríticas humanas;

- (j) aumenta a expressão de ICAM, MHC-II, B7-2 e/ou CD83 na superfície de células dendríticas humanas;
- (k) aumenta a expressão de interferão-gama pelas células T humanas durante estimulação alogénica;
- (l) liga-se a CD40 humano na presença de CD40L humano; e
- (m) liga-se a um epítopo de CD40 humano contido no domínio 1 e domínio 2 do domínio extracelular de CD40.

10. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9 que é:

- (a) uma imunoglobulina G (IgG), uma molécula de IgM, IgE, IgA ou IgD, ou é derivada da mesma; ou
- (b) um fragmento Fab, um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento F_v , um anticorpo de cadeia simples, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico ou um anticorpo biespecífico.

11. Uma linha celular que produz o anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10.

12. A linha celular de acordo com a reivindicação 11 que produz anticorpo 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605) ou um anticorpo que tem as mesmas sequências de aminoácidos que o anticorpo 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605).

13. Uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antígeno da mesma, uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve ou uma porção de ligação a antígeno da mesma, ou sequências de nucleótidos que codificam ambas as cadeias leve e pesada ou porções de ligação a antígeno das mesmas, de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10.

14. A molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 13, em que a dita molécula de ácido nucleico isolada compreende uma sequência de nucleótidos seleccionada a partir do grupo que consiste em:

(a) uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos da cadeia pesada ou uma porção de ligação a antigénio da mesma de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);

(b) uma sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos da cadeia leve ou uma porção de ligação a antigénio da mesma de 21.4.1 (Nº de Depósito de ATCC PTA-3605);

(c) uma sequência de nucleótidos que codifica uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 42, 44, 46, e 48, ou a dita sequência de aminoácidos sem uma sequência sinal se estiver presente; e

(d) uma sequência de nucleótidos seleccionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOS: 41, 43, 45, e 47, ou a dita sequência sem uma sequência de nucleótidos que codifica uma sequência sinal se estiver presente.

15. Um vector que compreende a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 13 ou 14, em que o vector compreende opcionalmente uma sequência de controlo de expressão operativamente ligada à molécula de ácido nucleico.

16. Uma célula hospedeira que compreende:

a) uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antigénio da mesma e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve ou uma porção de ligação a antigénio da mesma, ou uma sequência de nucleótidos que codifica ambas as cadeias

leve e pesada ou porções de ligação a antígeno das mesmas, de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10; ou
b) o vector de acordo com a reivindicação 15.

17. Um método de preparação de um anticorpo anti-CD40 ou uma porção de ligação a antígeno do mesmo, que compreende cultivar a célula hospedeira de acordo com a reivindicação 16 ou a linha celular de acordo com a reivindicação 11 sob condições adequadas e recuperar o dito anticorpo ou porção de ligação a antígeno.

18. Uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

19. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10 para utilização no tratamento de cancro ou para aumentar uma resposta imune.

20. O anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10 para utilização no tratamento de um tumor CD40 negativo.

21. Um medicamento que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia pesada ou uma porção de ligação a antígeno da mesma e uma sequência de nucleótidos que codifica a cadeia leve ou uma porção de ligação a antígeno da mesma, ou uma sequência de nucleótidos que codifica ambas as cadeias leve e pesada ou porções de ligação a antígeno das mesmas, de um anticorpo ou porção de ligação a antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-10, para utilização no tratamento de cancro ou para aumentar uma resposta imune.

Fig. 2 – Alinhamento de sequências de proteína de domínio variável de anticorpo com sequências de linha germinal (LG)
(CDRs estão sublinhadas; mutações da linha germinal estão em negrito/sombreadas)

Fig. 2A

Linha germinal Vα3/A19, J=JH1

22.1.1 DIVVTQPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSGNYLWYLPQCSQPHLLIYGNRASGVPRFSGSGCTDFTLAIKSRVSEEDVGVYCHQALQTPTFGQSTRVIR
23.5.1 DIVVTQPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSGNYLWYLPQCSQPHLLIYGNRASGVPRFSGSGCTDFTLAIKSRVSEEDVGVYCHQALQTPTFGQSTRVIR
23.15.1 DIVVTQPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSGNYLWYLPQCSQPHLLIYGNRASGVPRFSGSGCTDFTLAIKSRVSEEDVGVYCHQALQTPTFGQSTRVIR
Germinal DIVVTQPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSGNYLWYLPQCSQPHLLIYGNRASGVPRFSGSGCTDFTLAIKSRVSEEDVGVYCHQALQTPTFGQSTRVIR

Fig. 2B

Linha germinal Vα3/A19, J=JH3

0.2.1 DIVVTQPLSLPVTGEPASISCRSSQSVYVMGYLWYLPQCSQPHLLIYGNRASGVPRFSGSGCTDFTLAIKSRVSEEDVGVYCHQALQTPTFGQSTRVIR
Germinal DIVVTQPLSLPVTGEPASISCRSSQSLHSGNYLWYLPQCSQPHLLIYGNRASGVPRFSGSGCTDFTLAIKSRVSEEDVGVYCHQALQTPTFGQSTRVIR

Fig. 2C

Linha germinal Vα27, J=JH3

21.18.1 EIVLTQSPETLSLSPGERATLSCASQSVSSDLAMQCPQAPRLIYKSSRATGIPRFSGSGCTDFTLISRLSPDFNAYVQCWERS-LFTFGSGTKVDIK
21.28.1L-C92A EIVLTQSPETLSLSPGERATLSCASQSVSSDLAMQCPQAPRLIYKSSRATGIPRFSGSGCTDFTLISRLSPDFNAYVQCWERS-LFTFGSGTKVDIK
21.2.1 EIVLTQSPETLSLSPGERATLSCASQSVSSDLAMQCPQAPRLIYKSSRATGIPRFSGSGCTDFTLISRLSPDFNAYVQCWERS-LFTFGSGTKVDIK
Germinal EIVLTQSPETLSLSPGERATLSCASQSVSSDLAMQCPQAPRLIYKSSRATGIPRFSGSGCTDFTLISRLSPDFNAYVQCWERS-LFTFGSGTKVDIK

Fig. 2D

Linha germinal Vα3-30*, D=D1H3+D6-19, J=JH4

13.2.1 QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
Germinal QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS

Fig. 2E

Linha germinal Vα3-30*, D=D1-1, J=JH6

21.1.1 QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
21.1.1H-C109A QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
Germinal QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS

Fig. 2F

Linha germinal Vα3-30*, D=D4-17, J=JH6

21.5.1 QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
Germinal QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS

Fig. 2G

Figura 2G

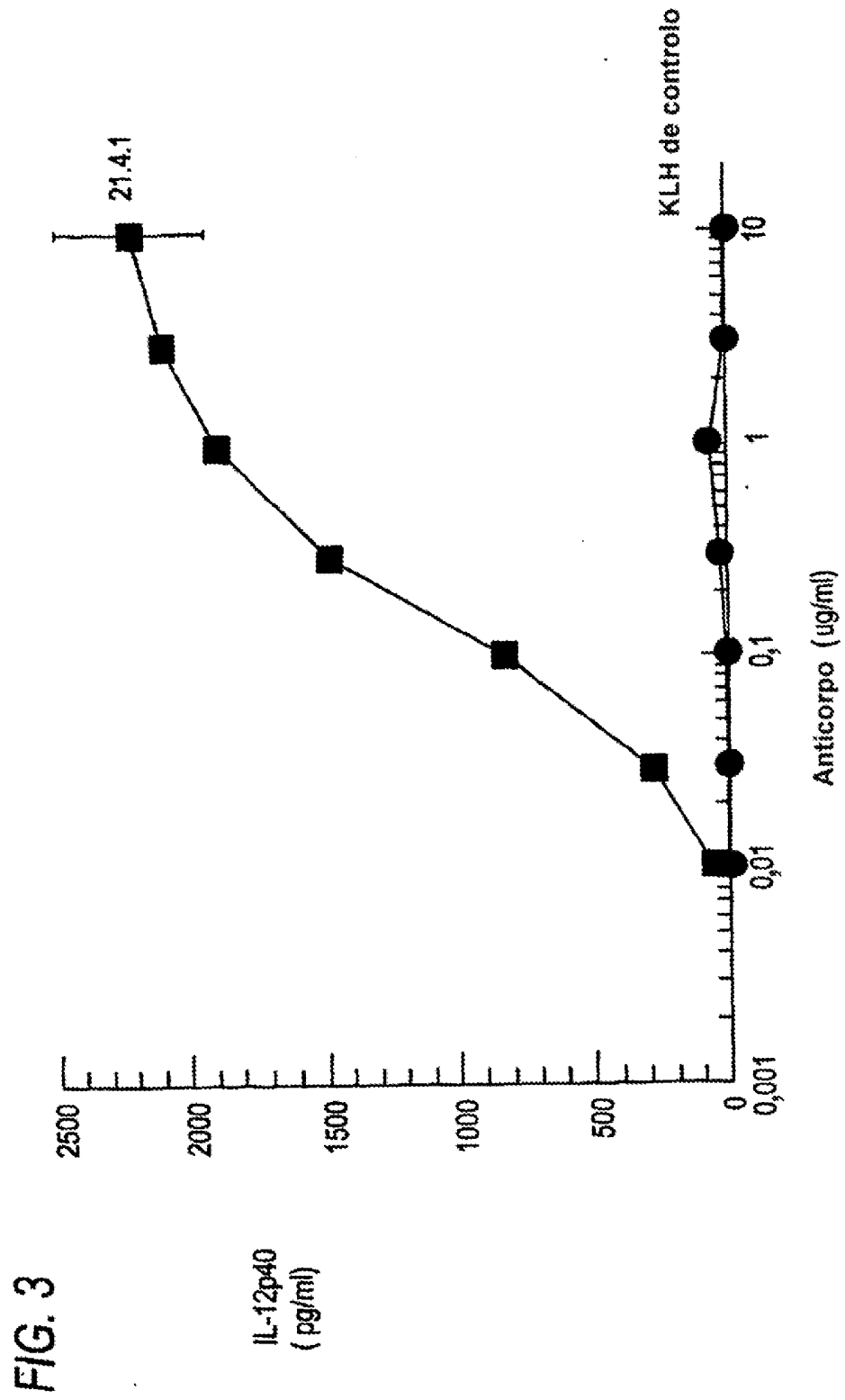
Linha germinal Vα3-30.3, D=D4-17, J=JH6

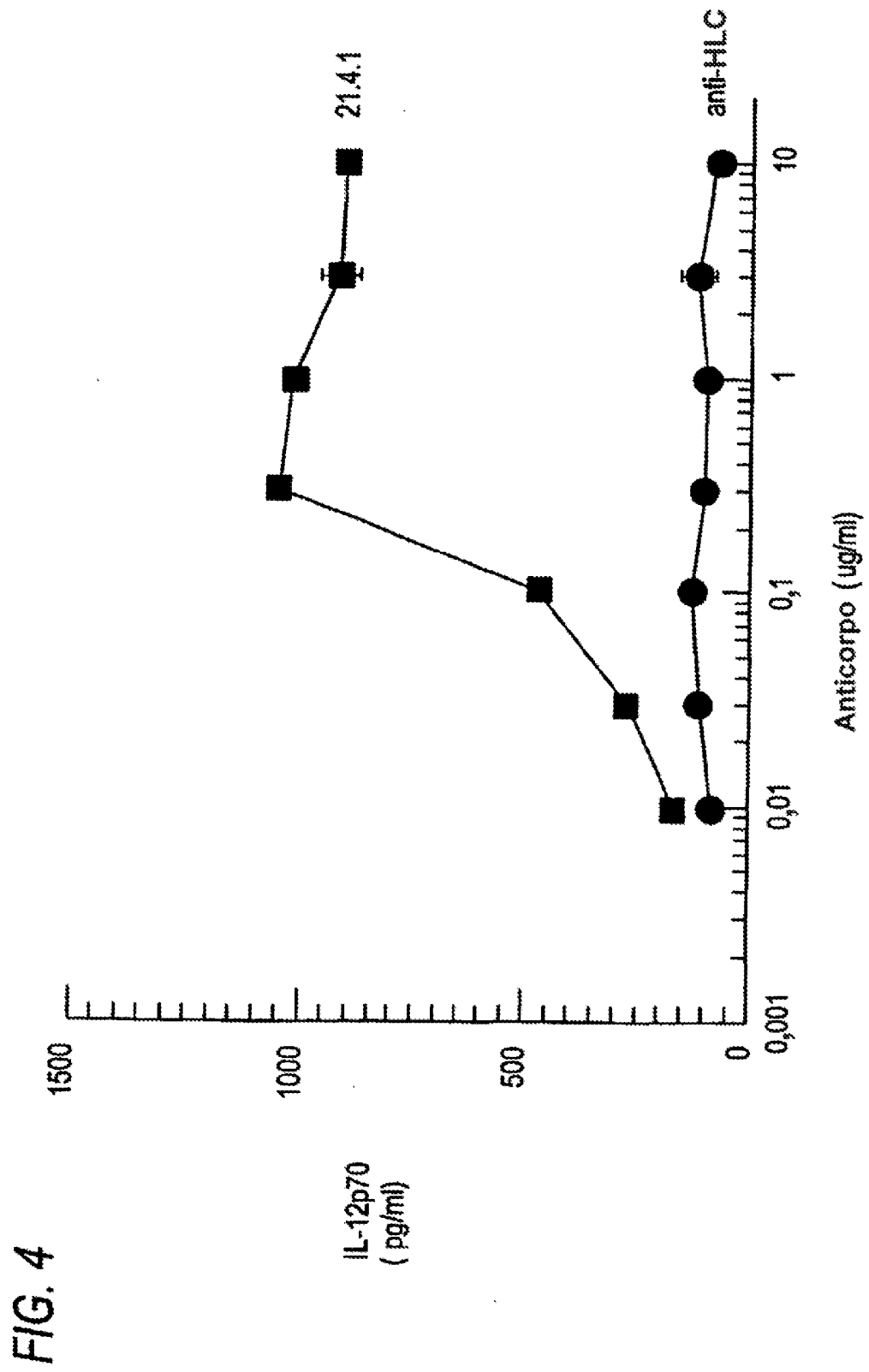
23.19.1 QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
Germinal QVQVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFSYVNMHVQRQAPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS

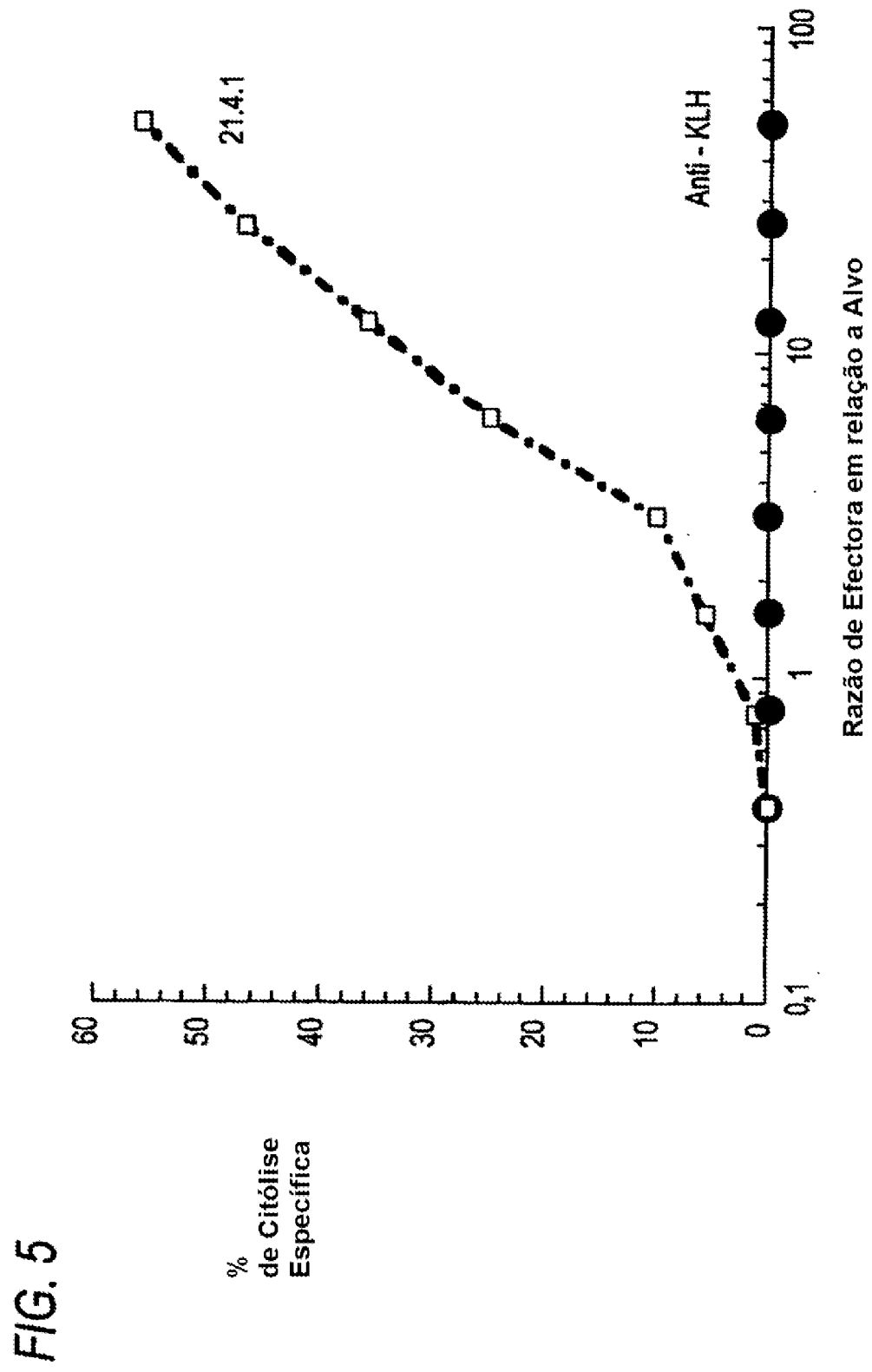
Fig. 2H

Linha germinal Vα4-16, D=D1E1+D4-17, J=JH5

23.28.1 QVQGESGPGLVKPSFETLSLCTVSGGSIKGYTNWNIHQPFPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
23.28.1H-D16E QVQGESGPGLVKPSFETLSLCTVSGGSIKGYTNWNIHQPFPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
24.2.1 QVQGESGPGLVKPSFETLSLCTVSGGSIKGYTNWNIHQPFPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS
Germinal QVQGESGPGLVKPSFETLSLCTVSGGSIKGYTNWNIHQPFPGKLEWAVISYDGSNRYVADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQHNSLAEDTAIVYTCAR-DGCK-----AVDGHVWGQGLTVVSS







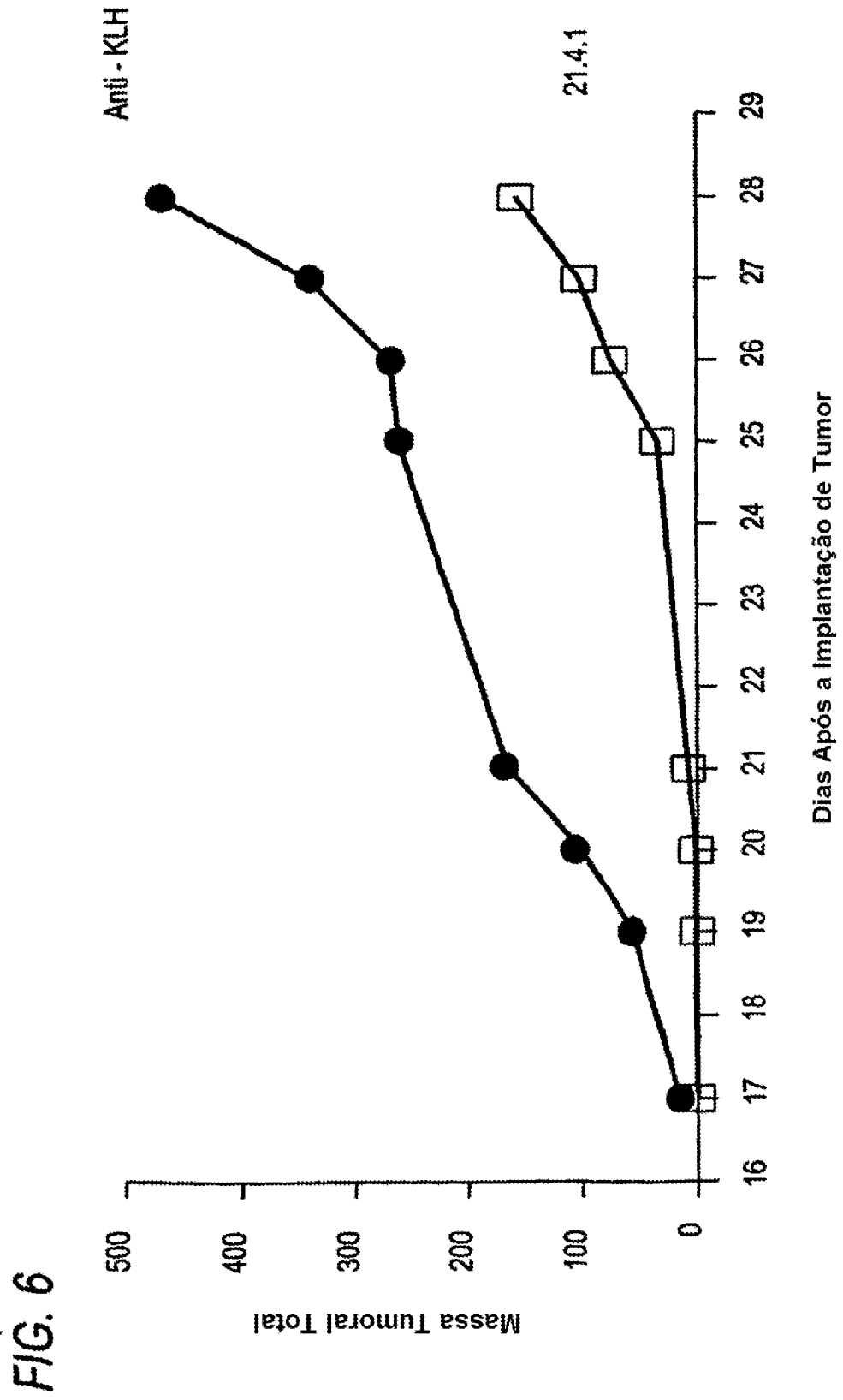


FIG. 8

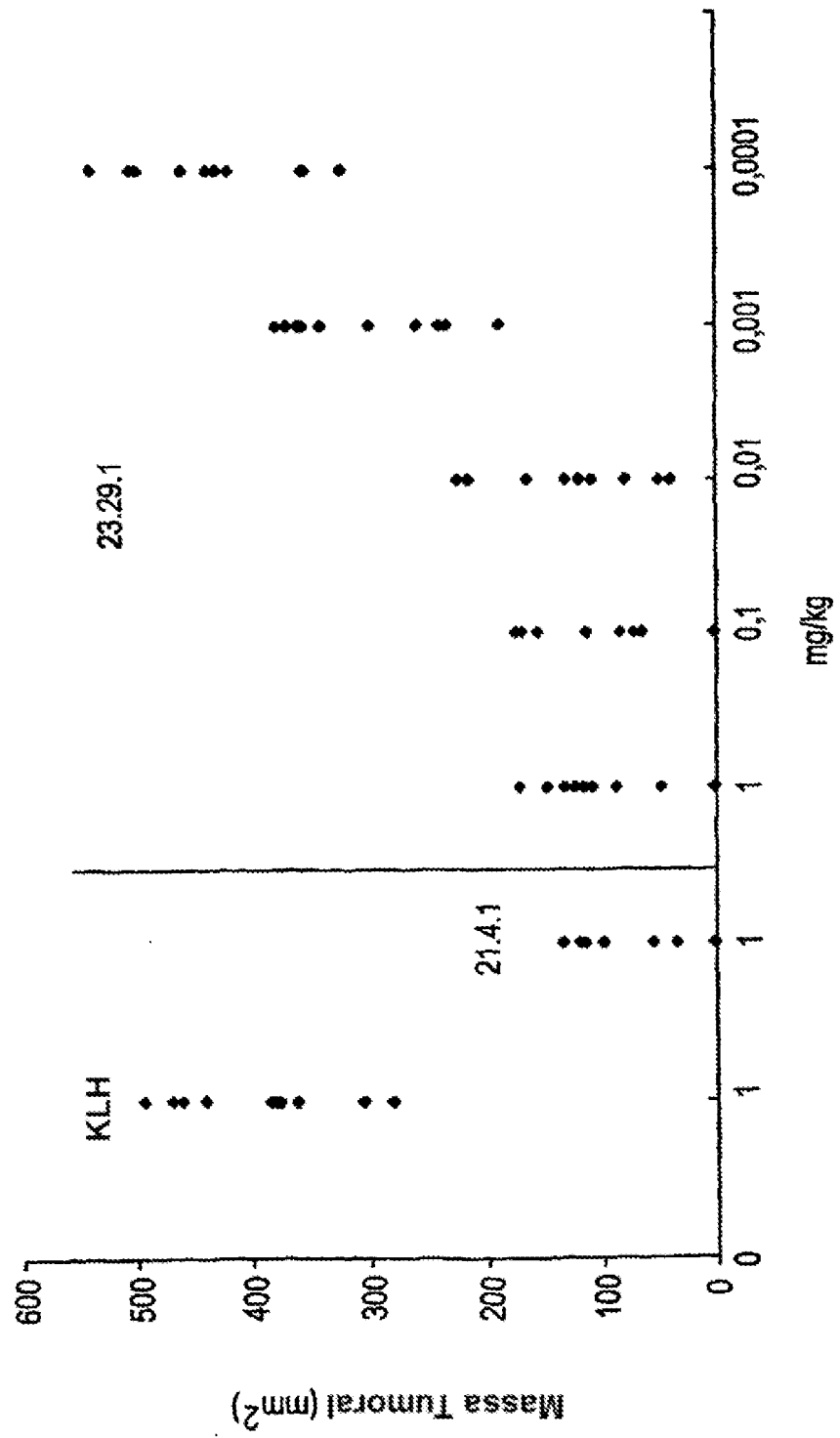


FIG. 9

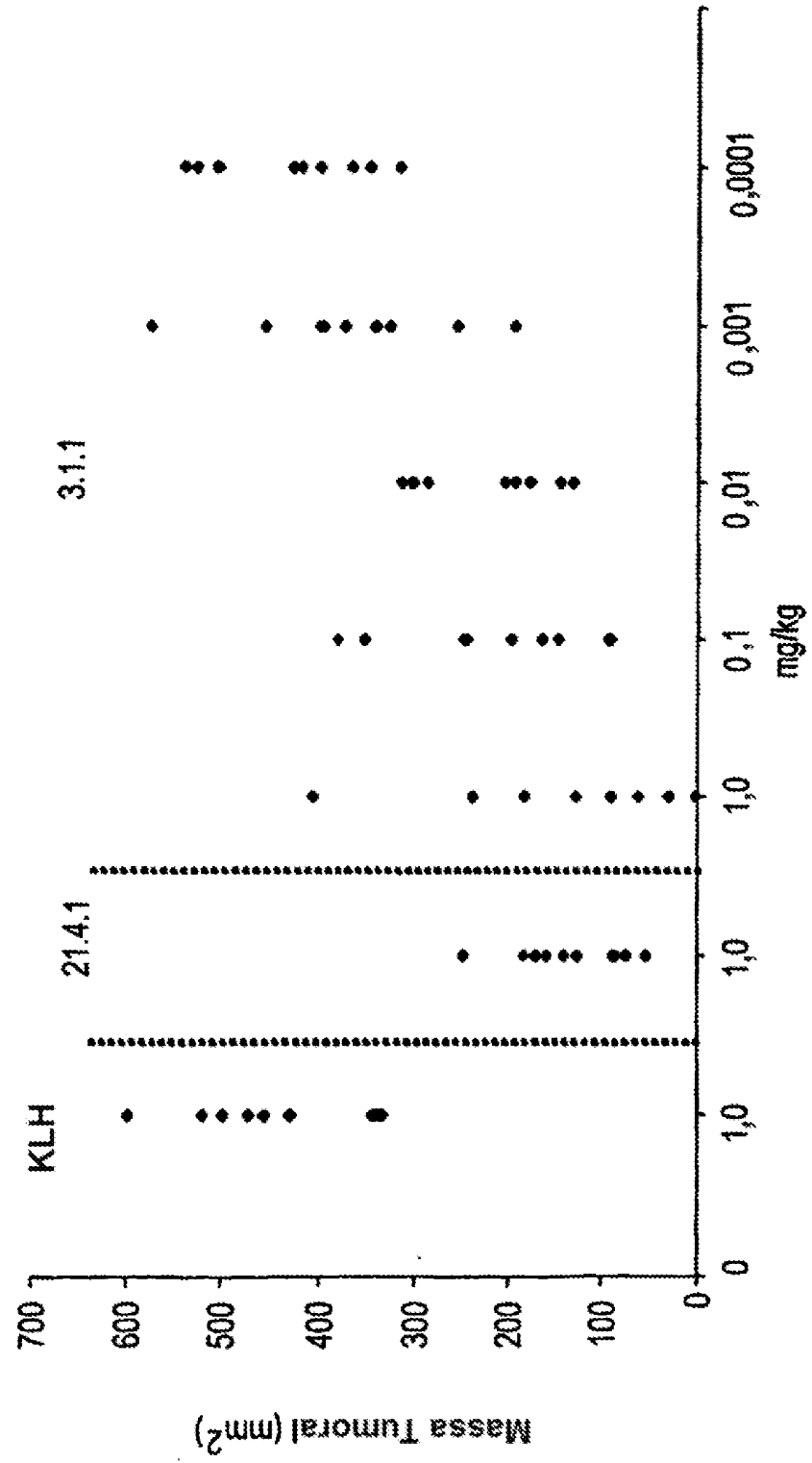


FIG. 10

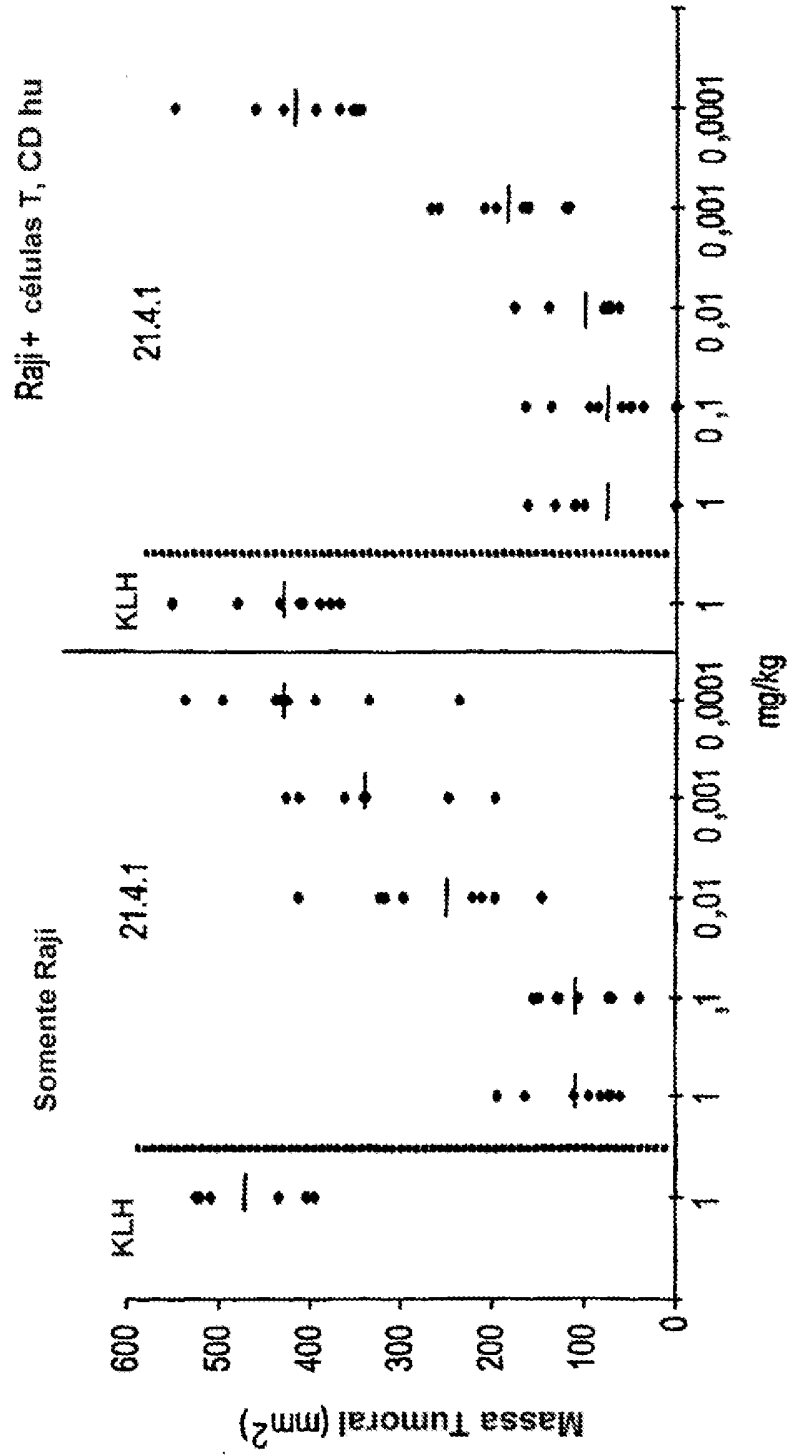




FIG. 12

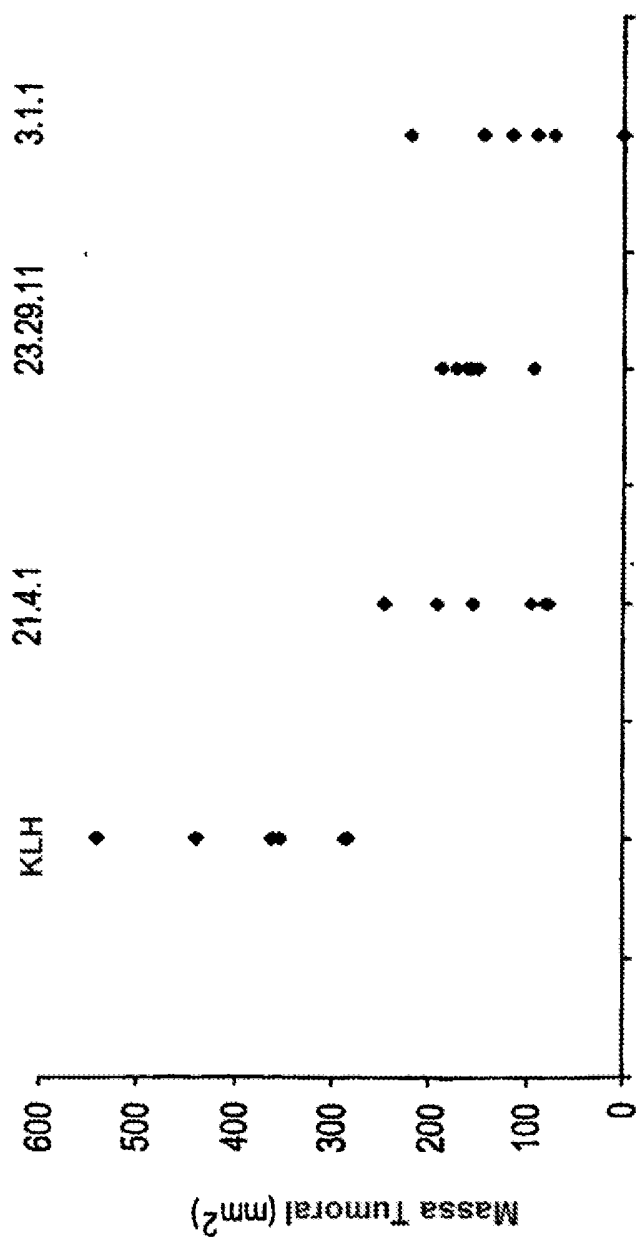


FIG. 13

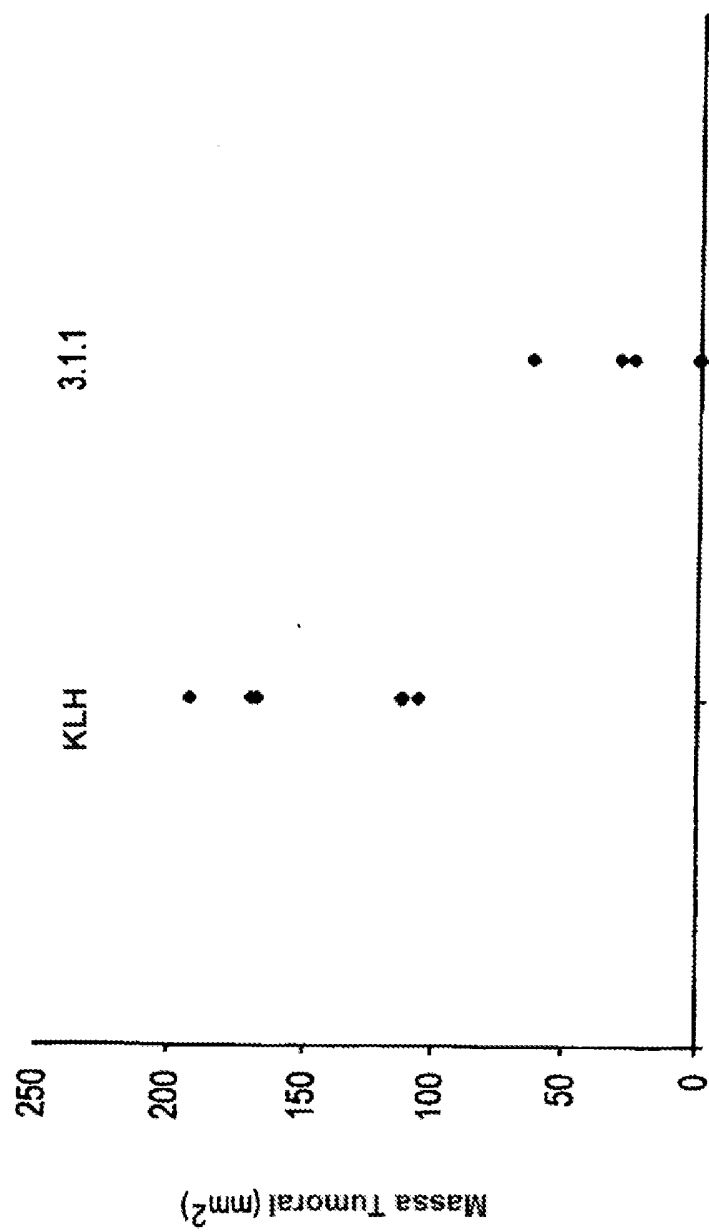


FIG. 14

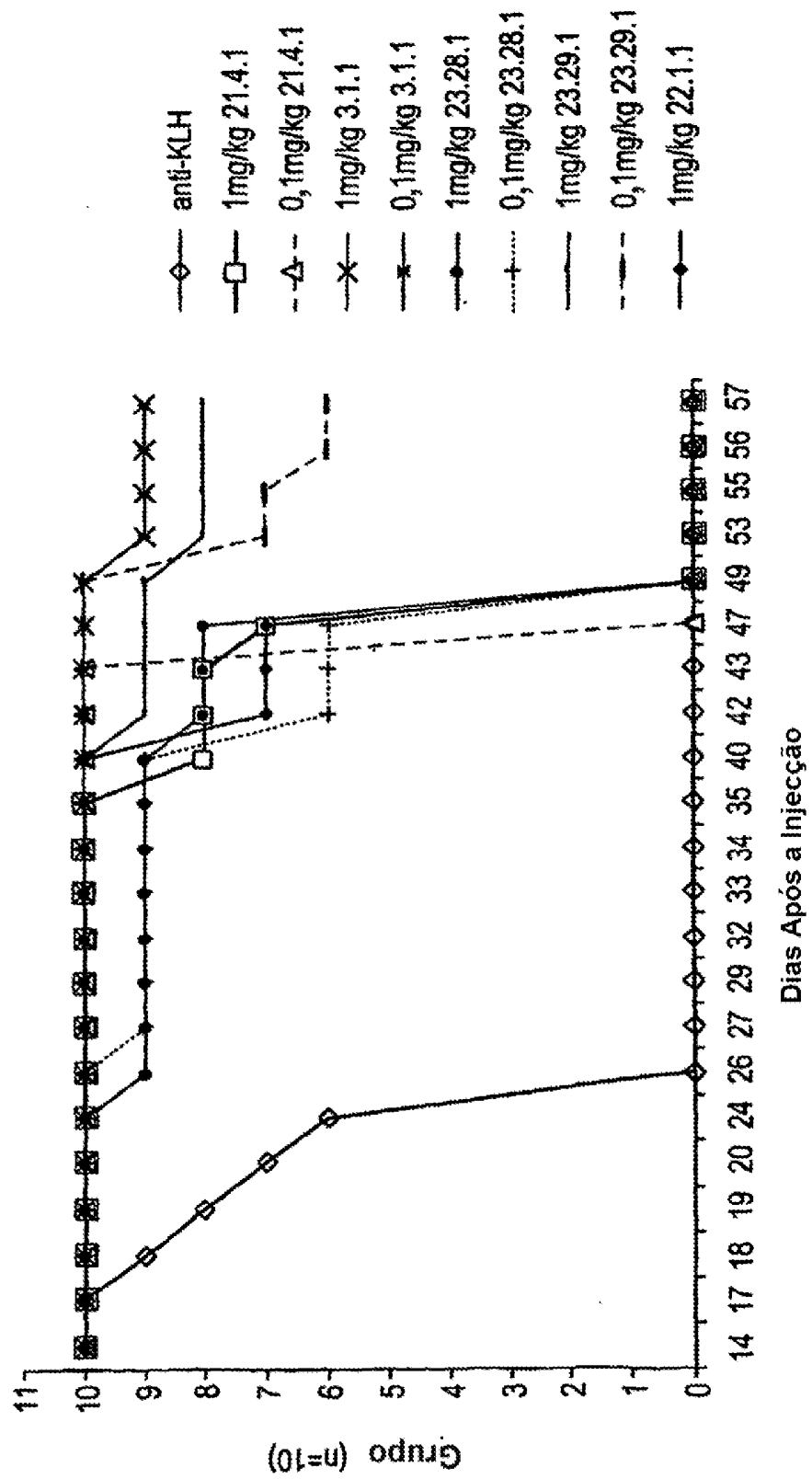


FIG. 15

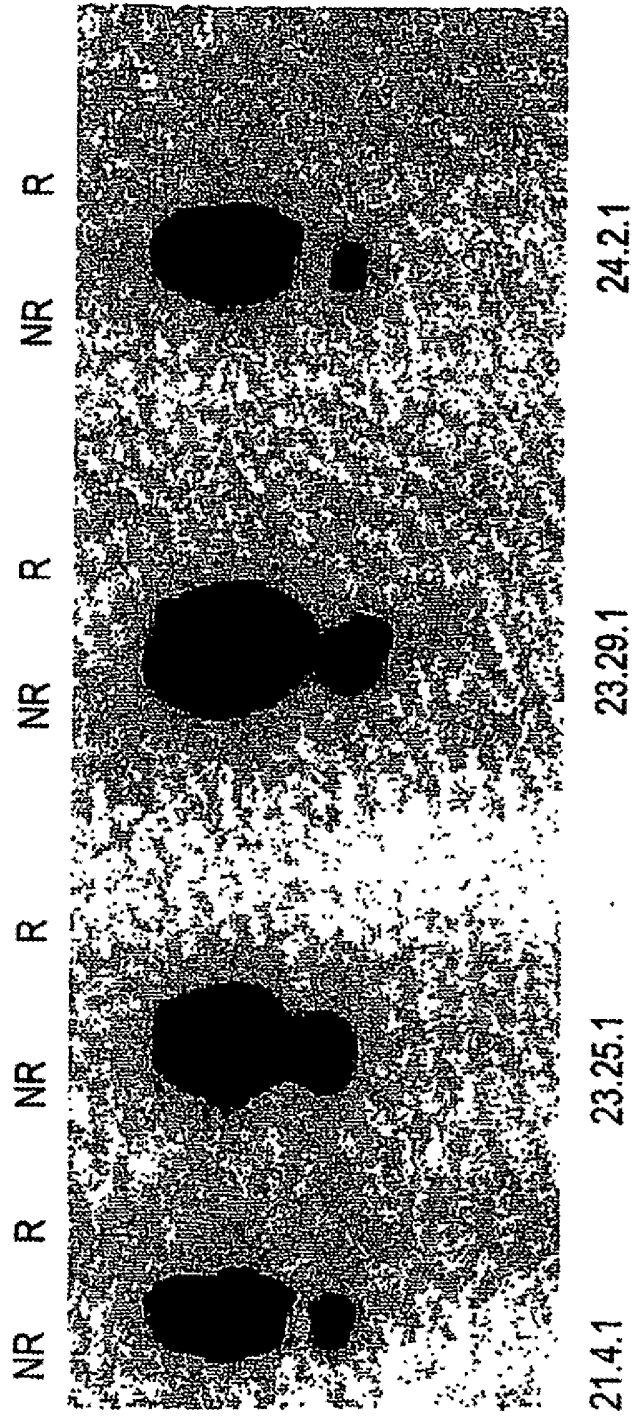


FIG. 16

	D1
Ratinho	VTCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSHCTALEKTQCH
Humano	TACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECL
	D2
Ratinho	PCDSGEFSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGTAESDTVCT
Humano	PCGESEFFLDTWNNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICT
	D3
Ratinho	CKEGQHCTSKDCEACAQHTPCI PGFGVMEMATETTDTVCHP
Humano	CEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEP
	D4
Ratinho	CPVGFFSNQSSLFEEKYPWTSCEDKNLEVLQKGTSTQTNVICG
Humano	CPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCG

FIG. 17

Ratinho	MVSLPRLCALWGCLLTAVHLGQCVCSDKQYLHDGQCCDLCQPGSRLTSH	
Humano	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSD	
Ratinho	ALEKTQCHPCDSGE FSAQWNREIRCHQHRHCEPNQGLRVKKEGT AESD	
Humano	EFFETECLPCGESE FLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGT SETD	
	EcoRI	BanI
Ratinho	TVCTCKEGQHCTSKDCEACAQHTPCIPGFGVMEMATETTDTVCHPCPHHHH	
Humano	TICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPHHHH	

FIG. 18

