



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

(11) PI 0317376-3 B1



(22) Data do Depósito: 16/12/2003

(45) Data de Concessão: 03/12/2019

(54) Título: PROTEÍNA DE FUSÃO DE ANTICORPO-IL2 DESIGNADA COMO HU14.18-IL2, USOS DA MESMA, VETOR E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/30; C12N 15/13; C12N 5/10; C07K 19/00; A61K 39/395; (...).

(30) Prioridade Unionista: 17/12/2002 US 60/433,945.

(73) Titular(es): MERCK PATENT GMBH.

(72) Inventor(es): STEPHEN D. GILLIES; KIN-MING LO.

(86) Pedido PCT: PCT EP2003014295 de 16/12/2003

(87) Publicação PCT: WO 2004/055056 de 01/07/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/06/2005

(57) Resumo: "ANTICORPO HUMANIZADO (H14.18) DO ANTICORPO 14.18 DO CAMUNDONGO QUE SE LIGA A GD2 E SUA FUSÃO COM IL-2". A presente invenção refere-se a um anticorpo humanizado H14.18 que se liga ao glicoesfingolípido GD2 humano da superfície celular. O anticorpo compreende regiões variáveis modificadas, mais especificamente regiões modificadas da estrutura, que reduzem sua imunogenicidade quando administradas a um ser humano. O anticorpo pode ser acoplado a um agente terapêutico, tal como IL-2, e usado para tratamento de câncer.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROTEÍNA DE FUSÃO DE ANTICORPO-IL2 DESIGNADA COMO HU14.18-IL2, USOS DA MESMA, VETOR E COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA**".

[001] Esta invenção refere-se genericamente a anticorpos modificados. Mais particularmente, a invenção refere-se a anticorpos modificados com imunogenicidade reduzida, que se ligam especificamente ao glicosfingolípido GD2 da superfície celular humana, e seu uso como agentes terapêuticos.

Antecedentes da Invenção

[002] Tem havido progresso significativo no desenvolvimento de terapias baseadas em anticorpos nos últimos anos. Por exemplo, pesquisadores identificaram não somente uma série de marcadores específicos de cânceres, mas também uma série de anticorpos que se ligam especificamente a esses marcadores. Os anticorpos podem ser usados para distribuir certas moléculas, como por exemplo, uma toxina ou uma porção imunoestimulante, como por exemplo, uma citocina, para uma célula cancerosa que expressa o marcador, de modo a exterminar seletivamente a célula cancerosa.

[003] O anticorpo 14.18 é um anticorpo monoclonal derivado do camundongo, direcionado contra o glicosfingolípido GD2 da superfície celular. GD2 é um dissialogangliosídeo que é normalmente expressado apenas em um nível significativo sobre as membranas superficiais externas de células neuronais, onde sua exposição ao sistema imunológico é limitada pela barreira hematoencefálica.

[004] Muitas células tumorosas, em contraste, têm níveis anormais de expressão de glicosfingolídeos sobre a superfície celular. Por exemplo, GD2 é expressado sobre as superfícies de uma ampla gama de células tumorosas, inclusive neuroblastomas, meduloblastomas, astrocitomas, melanomas, câncer pulmonar de células pequenas,

osteossarcomas, e outros sarcomas do tecido mole. Assim sendo, GD2 é um marcador conveniente específico de tumor, para direcionar domínios de proteínas imunoestimulantes para células tumorosas, com o propósito de gerar uma resposta imune eficaz contra as células tumorosas, a fim de destruí-las. Embora o anticorpo do camundongo 14.18 (anticorpo m14.18) possa auxiliar o direcionamento destes domínios protéicos para células tumorosas, suas seqüências de aminoácidos derivadas do camundongo podem prejudicar o efeito terapêutico desejado.

[005] Quando administrados a um paciente, os anticorpos podem ter uma imunogenicidade associada no mamífero hospedeiro. Isso é mais possível de ocorrer quando os anticorpos não são autólogos. Conseqüentemente, a eficácia de terapias baseadas em anticorpos está freqüentemente limitada por uma resposta imunogênica direcionada contra o anticorpo terapêutico. Esta resposta imunogênica é tipicamente aumentada quando o anticorpo é derivado, no todo ou em parte, de um mamífero diferente do mamífero hospedeiro, como por exemplo, quando o anticorpo é derivado de um camundongo e o receptor é um ser humano.

[006] Para uso clínico em seres humanos, pode ser útil modificar os anticorpos derivados do camundongo para que se assemelhem mais estreitamente a anticorpos humanos, de modo a reduzir ou minimizar a imunogenicidade do anticorpo derivado do camundongo. A imunogenicidade do anticorpo derivado do camundongo pode ser reduzida pela criação de um anticorpo quimérico no qual as regiões constantes de um anticorpo humano são fundidas aos domínios variáveis do camundongo. Entretanto, os domínios variáveis remanescentes do camundongo são genericamente ainda imunogênicos em seres humanos, e podem assim prejudicar a eficácia de uma terapia baseada em anticorpos.

[007] Algumas abordagens para reduzir a imunogenicidade, tais como "envernizamento" e "humanização", envolvem a introdução de muitas substituições de aminoácidos e podem romper a ligação de um anticorpo a um antígeno. O anticorpo m14.18 se liga a GD2 com afinidade moderada. Portanto, presume-se que as mutações que baixam significativamente a afinidade de m14.18 por GD2 tornem-no menos eficaz para propósitos terapêuticos em seres humanos. Conseqüentemente, existe uma necessidade nessa área de se obter anticorpos terapêuticos que possam atingir GD2 eficazmente e tenham imunogenicidade reduzida quando administrados a um ser humano.

Sumário da Invenção

[008] Genericamente, a presente invenção fornece uma forma modificada do anticorpo m14.18, que é menos imunogênica em seres humanos, mas ainda mantém a afinidade de ligação de m14.18 por GD2 humano.

[009] Mais particularmente, a invenção fornece uma forma humanizada do anticorpo m14.18 (anticorpo hu14.18), na qual vários aminoácidos específicos de camundongo, em uma ou mais regiões da estrutura, foram substituídos por aminoácidos diferentes, para reduzir sua imunogenicidade em seres humanos. A invenção fornece também fusões do anticorpo hu14.18 a uma ou mais porções diferentes de imunoglobulina, para intensificar os efeitos da imunoterapia almejada.

[0010] Em um aspecto, a presente invenção fornece uma região variável de anticorpo, a qual inclui a seqüência de aminoácidos enunciada em SEQ ID NO: 1, que define uma região variável de cadeia longa de imunoglobulina (região V_L). Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma região variável de anticorpo, que inclui a seqüência de aminoácidos enunciada em SEQ ID NO: 2, que define uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina (região V_H). Em uma modalidade, a invenção fornece uma região variável de anticorpo, na qual a

seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 está ligada à seqüência de aminoácidos enunciada em SEQ ID NO: 2. As seqüências de aminoácidos podem ser ligadas, por exemplo, por uma ligação dissulfeto e uma ligação peptídica.

[0011] Em outro aspecto, a invenção refere-se a uma região variável de anticorpo, que se liga especificamente a GD2 e inclui pelo menos os aminoácidos 1-23 de SEQ ID NO: 1, os aminoácidos 1-25 de SEQ ID NO: 2, ou os aminoácidos 67-98 de SEQ ID NO: 2. Estas seqüências definem regiões da estrutura nas regiões variáveis de imunoglobulina do anticorpo hu14.18. As regiões da estrutura estão descritas mais detalhadamente abaixo.

[0012] Um aspecto da invenção refere-se a um método para atingir uma célula que tem GD2 sobre sua superfície e inclui administrar uma região variável de anticorpo da presente invenção a um paciente. Em uma modalidade, a célula atingida é uma célula tumoral. Outros aspectos da invenção incluem um ácido nucléico que codifica a região variável do anticorpo ou uma célula que inclui este ácido nucléico, e qualquer uma das duas pode ser administrada a um paciente ou usada para a produção de proteínas *in vitro*.

[0013] A invenção fornece também um polipeptídeo que inclui uma região variável de anticorpo da invenção e uma parte Fc que compreende, pelo menos, um domínio CH2, ácidos nucléicos que codificam o polipeptídeo, células que incluem os ácidos nucléicos, e métodos para atingir uma célula que tem GD2 sobre sua superfície administrando o polipeptídeo, ácido nucléico, ou célula a um paciente. Em algumas modalidades da invenção, a parte Fc é derivada de IgG1.

[0014] A região variável do anticorpo pode estar ligada, com ou sem a parte Fc interveniente, a uma porção diferente de imunoglobulina. Especificamente, a porção diferente de imunoglobulina pode ser uma citocina, tal como uma interleucina, um fator hematopoiético, uma

linfocina, um interferon, ou uma quimiocina. A interleucina pode ser, por exemplo, interleucina-2 ou interleucina-12. O fator hematopoiético e a linfocina podem ser, por exemplo, o fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e uma linfoxina, respectivamente. O interferon pode ser, por exemplo, interferon- α , interferon- β , ou interferon- γ . Em algumas modalidades da invenção, a proteína de fusão inclui uma segunda porção diferente de imunoglobulina, tal como uma segunda citocina. Em uma modalidade específica, a proteína de fusão inclui a região variável do anticorpo, IL-2, e IL-12.

[0015] Deve-se entender que as características das várias modalidades descritas neste relatório descritivo não são mutuamente excluídas e podem existir em várias combinações e permutações.

Descrição dos Desenhos

[0016] A Figura 1A ilustra a seqüência de aminoácidos de uma região variável de cadeia leve de imunoglobulina, de acordo com a invenção.

[0017] A Figura 1B ilustra a seqüência de aminoácidos de uma região variável de cadeia pesada de imunoglobulina, de acordo com a invenção.

[0018] As Figuras 2A-D ilustram a seqüência de nucleotídeos de um vetor de expressão, incluindo os constructos de ácidos nucleicos que codificam uma proteína de fusão de IL-2 com cadeia leve de imunoglobulina e cadeia pesada de imunoglobulina, de acordo com a invenção.

[0019] A Figura 3A ilustra a seqüência de aminoácidos de uma cadeia leve de imunoglobulina, de acordo com a invenção.

[0020] A Figura 3B ilustra a seqüência de aminoácidos de uma cadeia pesada de imunoglobulina, de acordo com a invenção.

Descrição Detalhada da Invenção

[0021] A presente invenção fornece uma forma modificada do anti-

corpo m14.18, que é menos imunogênica em seres humanos, mas ainda é capaz de ligar-se especificamente ao GD2 humano. A imunogenicidade reduzida é conferida por uma ou mais seqüências de aminoácidos alteradas nos domínios variáveis de imunoglobulina. O anticorpo é útil para tratar tumores GD2-positivos, particularmente quando fundido a uma citocina ou outro modulador imunológico.

[0022] Como aqui utilizado, o termos "anticorpo" e "imunoglobulina" devem ser entendidos como significando (i) um anticorpo intacto (como por exemplo, um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal), (ii) as partes dele que se ligam a antígenos, incluindo, por exemplo, um fragmento Fab, um fragmento Fab', um fragmento (Fab')₂, um fragmento Fv, um sítio de ligação de anticorpo de cadeia única, um sFv, (iii) anticorpos biespecíficos e as partes deles que se ligam a antígenos, e (iv) anticorpos multiespecíficos e as partes deles que se ligam a antígenos.

[0023] Como aqui utilizados, os termos "ligam-se especificamente a", "ligam especificamente" e "ligação específica" devem ser entendidos como significando que o anticorpo tem uma afinidade de ligação por um antígeno específico de pelo menos cerca de $10^6 M^{-1}$, mais preferivelmente pelo menos cerca de $10^7 M^{-1}$, mais preferivelmente pelo menos cerca de $10^8 M^{-1}$, e com a maior preferência, pelo menos cerca de $10^{10} M^{-1}$.

[0024] Como aqui utilizados, os termos "Regiões da Estrutura" e "FRs" devem ser entendidos como significando as regiões de uma região variável de imunoglobulina adjacente às Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs). As CDRs são as partes de uma região variável de imunoglobulina, que interagem primordialmente com um antígeno. Como ilustrado na Figura 1, as regiões V_H e V_L contêm, ambas, quatro FRs e estão localizadas dentro das partes em *boxes* das seqüências de aminoácidos.

[0025] Particularmente, com relação à seqüência de aminoácidos indicada na Figura 1A (SEQ ID NO: 1), as FRs de cadeia leve são definidas pelas seqüências de aminoácidos entre Asp1 e Cys23 (hu_{V_L}FR1), entre His39 e His54 (hu_{V_L}FR2), entre Gly62 e Cys93 (hu_{V_L}FR3), e entre Phe104 e Lys113 (hu_{V_L}FR4). Com relação à seqüência de aminoácidos indicada na Figura 1B (SEQ ID NO: 2), as FRs de cadeia pesada são definidas pelas seqüências de aminoácidos entre Glu1 e Ser25 (hu_{V_H}FR1), entre Trp36 e Gly49 (hu_{V_H}FR2), entre Arg67 e Ser98 (hu_{V_H}FR3), e entre Trp103 e Ser113 (hu_{V_H}FR4).

Seqüências Protéicas de Invenção

[0026] A presente invenção apresenta anticorpos que se ligam, de preferência especificamente, ao glicosíngolípido GD2 humano da superfície celular, e têm regiões modificadas derivadas do anticorpo m14.18. As seqüências de aminoácidos V_H ou V_L (ou ambas) são modificadas ou humanizadas para reduzir sua imunogenicidade quando administradas a um ser humano. De acordo com a invenção, o anticorpo m14.18 pode ser humanizado, por exemplo, usando métodos de desimunização nos quais os epítomos potenciais de células T são eliminados ou enfraquecidos pela introdução de mutações que reduzem a ligação de um epítomo peptídico a uma molécula de MHC Classe II (vide, por exemplo, documentos n^{os} WO 98/52976 e WO 00/34317). Alternativamente, os epítomos de células T não-humanos são mutados de tal modo que eles correspondam a auto-epítomos humanos que estão presentes em anticorpos humanos (vide, por exemplo, patente US n^o 5.712.120). A presente invenção fornece anticorpos de GD2 que têm regiões V_L e V_H que incluem pelo menos uma seqüência FR humanizada, reduzindo desta forma imunogenicidade quando administrados a um ser humano.

I. Regiões Variáveis com Cadeias Pesada e Leve

[0027] Como mencionado acima, o hu14.18 inclui regiões variáveis

humanizadas derivadas do anticorpo m14.18, que conservam ligação específica do antígeno de GD2 humano. Em algumas modalidades da invenção, a região V_L do anticorpo hu14.18 inclui o seguinte polipeptídeo:

D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-N-G-N-T-Y-L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-C-S-Q-S-T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-L-K (SEQ ID NO: 1).

[0028] Em modalidades específicas, o anticorpo hu14.18 inclui uma FR1 de cadeia leve que é definida pelos resíduos 1 a 23 de SEQ ID NO: 1, a saber, D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S (hu V_L FR1).

[0029] Em outras modalidades da invenção, a região V_H do anticorpo hu14.18 inclui o seguinte polipeptídeo:

E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-N-M-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G-A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S-G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S (SEQ ID NO: 2).

[0030] Em modalidades específicas, o anticorpo hu14.18 inclui uma FR1 de cadeia pesada que é definida pelos resíduos 1 a 25 de SEQ ID NO: 2, a saber, E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S (hu V_H FR1).

[0031] Em outras modalidades da invenção, o anticorpo hu14.18 inclui uma FR3 com cadeia pesada, que é representada pelos resíduos 67 a 98 de SEQ ID NO: 2, a saber, R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S (hu V_H FR3).

[0032] Várias combinações das modalidades precedentes também estão dentro do escopo da presente invenção. Por exemplo, o anticorpo hu14.18 pode incluir a seqüência V_L enunciada em SEQ ID NO: 1 e a seqüência V_H

enunciada em SEQ ID NO: 2. As regiões V_L e V_H podem ser ligadas por uma ligação dissulfeto ou uma ligação peptídica, dependendo de como suas seqüências de ácidos nucleicos são construídas. Genericamente, as regiões V estão ligadas por uma ligação dissulfeto quando suas seqüências são codificadas em constructos de DNA separados. Em contraste, as regiões V estão ligadas tipicamente por uma ligação peptídica quando suas seqüências são codificadas em um constructo de cadeia única de DNA.

[0033] A presente invenção contempla também um anticorpo que se liga especificamente a GD2 e inclui pelo menos uma parte das regiões V humanizadas. Por exemplo, o anticorpo hu14.18 pode incluir uma região V_L como definida por SEQ ID NO: 1 e uma região V_H que tem pelo menos uma FR humanizada, tal como hu V_H FR1 ou hu V_H FR2. Alternativamente, o anticorpo da presente invenção pode incluir uma região V_H como definida por SEQ ID NO: 2 e uma região V_L que tem pelo menos uma FR humanizada, tal como hu V_L FR1. O anticorpo hu14.18 pode incluir também uma região V_H que tem pelo menos uma FR humanizada e/ou uma região V_L que tem pelo menos uma FR humanizada.

[0034] Em certas modalidades da invenção, a região variável de cadeia leve e a região variável de cadeia pesada podem estar acopladas, respectivamente, a uma região constante de cadeia leve e a uma região constante de cadeia pesada de uma imunoglobulina. As cadeias leves de imunoglobulinas têm regiões constantes desenhadas como cadeias kapa ou lambda. Em uma modalidade preferida da invenção, a região constante de cadeia leve é uma cadeia kapa. As regiões constantes de cadeia pesada, e várias modificações e combinações delas estão discutidas detalhadamente abaixo.

II. Parte Fc

[0035] Os domínios variáveis dos anticorpos da presente invenção

são opcionalmente fundidos a uma parte Fc. Como aqui utilizado, a parte Fc engloba domínios derivados da região constante de cadeia pesada de uma imunoglobulina, de preferência uma imunoglobulina humana, incluindo um fragmento, análogo, variante, mutante ou derivado da região constante. A região constante de uma cadeia pesada de imunoglobulina é definida como um polipeptídeo de ocorrência natural ou produzido sinteticamente, homólogo a pelo menos uma parte da região do terminal C da cadeia pesada, incluindo CH1, articulação, CH2, CH3, e, no caso de algumas classes de cadeias pesadas, os domínios CH4. A região de "articulação" une o domínio CH1 à região CH2-CH3 de uma parte Fc. A região constante das cadeias pesadas de todas as imunoglobulinas de mamíferos apresentam extensa similaridade de seqüências de aminoácidos. As seqüências de DNA para estas regiões de imunoglobulinas são bem conhecidas nesta área científica (vide, por exemplo, Gillies *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 125:191 (1989)).

[0036] Na presente invenção, a parte Fc inclui tipicamente, pelo menos, um domínio CH2. Por exemplo, a parte Fc pode incluir a região constante inteira de cadeia pesada de imunoglobulina (CH1-articulação-CH2-CH3). Alternativamente, a parte Fc pode incluir a região de articulação, o domínio CH2 e o domínio CH3, na sua totalidade ou em parte.

[0037] A região constante de uma imunoglobulina é responsável por muitas funções efetoras importantes de anticorpos, inclusive a ligação do receptor de Fc (FcR) e a fixação do complemento. Há cinco classes principais da região constante de cadeia pesada, classificadas como IgA, IgG, IgD, IgE e IgM, cada uma com funções efetoras características, desenhadas por isótipo.

[0038] IgG, por exemplo, é separada em quatro isótipos γ : γ_1 , γ_2 , γ_3 e γ_4 , também conhecidos como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, respecti-

vamente. As moléculas de IgG podem interagir com múltiplas classes de receptores celulares que incluem três classes de receptores de Fc γ (Fc γ R) específicos para a classe IgG de anticorpo, a saber, Fc γ RI, Fc γ RII, e Fc γ RIII. As seqüências importantes para a ligação de IgG aos receptores Fc γ R foram relatadas como estando nos domínios CH2 e CH3.

[0039] A meia-vida sérica de um anticorpo é influenciada pela capacidade de este anticorpo ligar-se a um receptor de Fc (FcR). Similarmemente, a meia-vida sérica de proteínas de fusão de imunoglobulinas também é influenciada pela incapacidade de ligar-se a tais receptores (Gillies *et al.*, *Cancer Research* 59:2159-66 (1999)). Os domínios CH2 e CH3 de IgG2 e IgG4 têm afinidade de ligação não-detectável ou reduzida por receptores de Fc, em comparação com os de IgG1. Conseqüentemente, a meia-vida sérica do anticorpo caracterizado pode ser aumentada usando o domínio CH2 e/ou CH3 dos isótipos IgG2 ou IgG4. Alternativamente, o anticorpo pode incluir um domínio CH2 e/ou CH3 de IgG1 ou IgG3 com modificação em um ou mais aminoácidos nestes domínios, para reduzir a afinidade de ligação por receptores de Fc (vide, por exemplo, pedido de patente US nº 09/256.156, publicado como publicação de pedido de patente US nº 2003-0105294-A1).

[0040] A região de articulação da parte Fc une-se normalmente ao terminal C do domínio CH1 da região constante de cadeia pesada. Quando incluída nas proteínas da presente invenção, a articulação é homóloga a uma região de imunoglobulina de ocorrência natural e inclui tipicamente resíduos cisteína ligando duas cadeias pesadas por intermédio de ligações dissulfeto, como em imunoglobulinas naturais. As seqüências representativas de regiões de articulação para imunoglobulina humana e do camundongo podem ser encontradas em "Antibody Engineering, a Practical Guide" (Borrebaeck, editor, W. H. Freeman and Co., 1992).

[0041] As regiões de articulação apropriadas para a presente invenção podem ser derivadas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, e outros isótipos de imunoglobulina. O isótipo IgG1 tem duas ligações dissulfeto na região de articulação, permitindo a formação eficiente e consistente de ligações dissulfeto. Portanto, uma região de articulação preferida da presente invenção é derivada de IgG1. Opcionalmente, a primeira cisteína mais próxima do terminal N de uma articulação de IgG1 é mutada para intensificar a expressão e a montagem de anticorpos ou proteínas de fusão de anticorpos da invenção (vide, por exemplo, pedido de patente US nº 10/093.958, publicado como publicação de pedido de patente US nº 2003-0044423-A1).

[0042] Em contraste com IgG1, a região de articulação de IgG4 forma reconhecidamente ligações dissulfeto entre cadeias ineficientemente (Angal *et al.*, *Mol. Immunol.* 30:105-8 (1993)). Além disso, a região de articulação de IgG2 tem quatro ligações dissulfeto que tendem a promover oligomerização e possivelmente ligação dissulfeto incorreta durante a secreção em sistemas recombinantes. Uma região de articulação apropriada para a presente invenção pode ser derivada da região de articulação de IgG4, de preferência contendo uma mutação que intensifica a formação correta de ligações dissulfeto entre porções derivadas de cadeias pesadas (Angal *et al.*, *Mol. Immunol.* 30:105-8 (1993)). Outra região de articulação preferida é derivada de uma articulação de IgG2 na qual as duas primeiras cisteínas são, cada uma, mutadas para outro aminoácido, tal como, em ordem de preferência genérica, serina, alanina, treonina, prolina, ácido glutâmico, glutamina, lisina, histidina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glicina, metionina, valina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, triptofano ou selenocisteína (vide, por exemplo, publicação de pedido de patente US nº 2003-0044423-A1).

[0043] Uma parte Fc fundida a uma região variável de anticorpo da

invenção pode conter domínios CH2 e/ou CH3 e uma região de articulação, que são derivadas de isotipos de anticorpo diferentes. Por exemplo, a parte Fc pode conter domínios CH2 e/ou CH3 de IgG2 ou IgG4 e uma região de articulação de IgG1. A montagem de tais partes Fc híbridas foi descrita na publicação do pedido de patente US nº 2003-0044423-A1).

[0044] Quando fundida a uma região variável de anticorpo da invenção, a parte Fc contém de preferência uma ou mais modificações de aminoácidos que prolongam genericamente a meia-vida sérica de uma proteína de fusão de Fc. Tais modificações de aminoácidos incluem mutações que diminuem substancialmente ou eliminam a ligação do receptor de Fc ou complementam a atividade de fixação. Por exemplo, um tipo de tal mutação remove o sítio de glicosilação da parte Fc de uma cadeia pesada de imunoglobulina. Em IgG1, o sítio de glicosilação é Asn297 (vide, por exemplo, pedido de patente US nº 10/310.719, publicado como publicação de pedido de patente US nº 2003-0166163-A1).

III. Região de Junção da Fusão

[0045] As regiões variáveis do anticorpo da presente invenção podem ser opcionalmente ligadas ou fundidas a uma porção diferente de imunoglobulina direta ou indiretamente, tal como através de um peptídeo ligante (como por exemplo, $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$ (SEQ ID NO: 3)). A imunogenicidade das proteínas de fusão descritas pode ser reduzida enfraquecendo a capacidade da junção da fusão ou o epítipo juntivo interagir com um receptor de células T, como descrito na publicação do pedido de patente US nº 2003-0166877-A1). Mesmo em uma fusão entre duas proteínas humanas, como por exemplo, Fc humana e IL-2 humana, a região que circunda a junção da fusão ou o epítipo juntivo inclui uma seqüência peptídica que não está normalmente presente no corpo humano, e assim sendo, que pode ser imunogênica. A imuno-

genicidade do epítopo juntivo pode ser reduzida, por exemplo, introduzindo um ou mais sítios de glicosilação perto da junção da fusão, ou identificando um candidato a epítopo de células T que estende a junção, como descrito na publicação de pedido de patente US nº 2003-0166877-A1, e mudando um aminoácido perto da junção, para reduzir a capacidade do candidato a epítopo de células T interagir com um receptor de células T.

[0046] A meia-vida sérica da proteína pode ser aumentada também introduzindo mutações dentro da região de junção da fusão. Por exemplo, em uma proteína que inclui um domínio CH3 fundido a uma porção diferente de imunoglobulina, a lisina do terminal C do domínio CH3 pode ser mudada para outro aminoácido, tal como alanina, que pode proporcionar um aumento substancial na meia-vida sérica da proteína de fusão resultante.

[0047] Em certas modalidades, a clivagem proteolítica da junção da fusão é desejável. Conseqüentemente, a região intergênica pode incluir uma seqüência de nucleotídeos que codifica um sítio de clivagem proteolítica. Este sítio, intercalado entre a imunoglobulina e a citocina, pode ser desenhado para proporcionar a liberação proteolítica da citocina no sítio-alvo. Por exemplo, é de pleno conhecimento que a plasmina e a tripsina clivam depois dos resíduos de lisina e arginina em sítios que são acessíveis às proteases. Outras endoproteases específicas de sítios e as seqüências de aminoácidos que elas reconhecem são bem conhecidas.

IV. Tratamento de Doença Humana com Proteína de Fusão do Anticorpo hu14.18

[0048] As regiões variáveis do anticorpo da presente invenção podem ser anexadas a um agente diagnóstico e/ou terapêutico. O agente pode ser fundido ao anticorpo para produzir uma proteína de fusão. Alternativamente, o agente pode ser acoplado quimicamente ao anti-

corpo para produzir um imunocombinado. O agente pode ser, por exemplo, uma toxina, um marcador radioativo, um agente reprodutor de imagem, uma porção imunoestimulante, ou similares.

[0049] A região variável do anticorpo da invenção pode ser anexada a uma citocina. As citocinas preferidas incluem interleucinas, tais como interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16 e IL-18, fatores hematopoiéticos, tais como o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e eritropoietina, fatores de necrose tumoral (TNF), tal como TNF, linfocinas, tal como linfotoxina, reguladores de processos metabólicos, tal como leptina, interferons tais como interferon α , interferon β e interferon γ , e quimiocinas. De preferência, a proteína de fusão anticorpo/citocina ou o imunocombinado apresenta atividade biológica de citocina. Em uma modalidade, o domínio variável do anticorpo está fundido a IL-2. De preferência, vários aminoácidos dentro da porção IL-2 são mutados para reduzir a toxicidade, como descrito na publicação de pedido de patente US nº 2003-0166163-A1.

[0050] Por exemplo, as Figuras 3A e 3B ilustram as seqüências de aminoácidos de uma modalidade específica de uma proteína de fusão de anticorpo de acordo com a invenção. Especificamente, a Figura 3A ilustra a seqüência peptídica de uma cadeia leve de imunoglobulina humanizada que inclui uma região variável e uma constante. A Figura 3B ilustra a seqüência peptídica de uma cadeia pesada de imunoglobulina humanizada ligada a IL-2. Os polipeptídeos fornecem uma proteína de fusão de anticorpo humanizada capaz de ligar-se especificamente a GD2 e estimular o sistema imunológico.

[0051] Opcionalmente, os complexos protéicos podem incluir ainda um segundo agente, tal como uma segunda citocina. Em uma modalidade, uma proteína de fusão do anticorpo hu14.18 inclui IL-12 e IL-2.

A construção de complexos protéicos que contêm um domínio de imunoglobulina e duas citocinas diferentes está descrita detalhadamente na patente US nº 6.617.135.

[0052] As proteínas de fusão da presente invenção são úteis no tratamento de doenças humanas, tal como câncer. Quando se trata tumores humanos, é particularmente útil administrar uma proteína de fusão anticorpo-IL-2 que compreende as regiões V da invenção, por infusão ou injeção subcutânea, usando doses de 0,1 a 100 miligramas/m²/paciente. Em uma modalidade preferida, é particularmente útil administrar uma proteína de fusão anticorpo-IL-2 compreendendo as regiões V da invenção, por infusão ou injeção subcutânea, usando doses de 1 a 10 mg/m²/paciente, e mais preferivelmente, cerca de 3 a 6 mg/m²/paciente.

[0053] Estudos clínicos demonstraram que após a administração de hu14.18/IL-2, a proteína de fusão conserva sua capacidade de ativar células responsivas a IL-2 através do receptor de IL-2 e conserva sua capacidade de ligar-se a células tumorosas GD2-positivas e distribuir IL-2 para sua superfície. Além disso, a administração da proteína de fusão hu14.18/IL-2 a pacientes com câncer resultou na estabilização da progressão da doença em um número surpreendentemente alto de pacientes (vide Exemplo 1).

[0054] As composições farmacêuticas da invenção podem ser usadas na forma de formas de dosagem sólidas, semi-sólidas ou líquidas, tais como, por exemplo, pílulas, cápsulas, pós, líquidos, suspensões, ou similares, de preferência em formas de dosagem unitária, apropriadas para administração de dosagens precisas. As composições incluem um veículo ou excipiente farmacêutico convencional e, além disso, podem incluir outros agentes medicinais, agentes farmacêuticos, veículos, adjuvantes, etc. Tais excipientes podem incluir outras proteínas, tais como, por exemplo, albumina sérica humana ou

proteínas plasmáticas. Os métodos reais para preparar tais formas de dosagem são conhecidos ou devem ser evidentes para os versados nessas técnicas. A composição ou formulação a ser administrada deve conter, em qualquer caso, uma quantidade do(s) componente(s) ativo(s) que seja eficaz para atingir o efeito desejado no indivíduo que está sendo tratado.

[0055] A administração das composições em questão pode ser por intermédio de qualquer um dos modos de administração aceitos para agentes que apresentam tal atividade. Estes métodos incluem administração oral, parenteral ou tópica, e formas diversamente sistêmicas. A injeção intravenosa em um veículo farmacologicamente aceitável é um método preferido de administração (vide Exemplo 1).

[0056] A quantidade administrada de composto ativo dependerá evidentemente do indivíduo que está sendo tratado, da gravidade da enfermidade, do modo de administração, e do julgamento do médico assistente.

Ácidos Nucléicos da Invenção

I. Constructos do Anticorpo hu14.18

[0057] A invenção fornece também ácidos nucleicos capazes de expressar cada um dos tipos de proteínas acima. Eles incluem, por exemplo, ácidos nucleicos que codificam a seqüência de aminoácidos enunciada em SEQ ID NO: 1; a seqüência de aminoácidos enunciada em SEQ ID NO: 2; uma região V_L do anticorpo hu14.18 que inclui a seqüência de aminoácidos de hu V_L FR1; uma região V_H do anticorpo hu14.18 que inclui a seqüência de aminoácidos de hu V_H FR1; uma região V_H do anticorpo hu14.18 que inclui a seqüência de aminoácidos de hu V_H FR3; e proteínas de fusão que compreendem um anticorpo hu14.18, incluindo pelo menos uma das seqüências de FR humanizadas precedentes e um ou mais agentes terapêuticos.

[0058] Os anticorpos hu14.18 desta invenção podem ser produzi-

dos por técnicas de engenharia genética, isto é, formando um constructo de ácido nucléico que codifica um anticorpo específico para GD2, que contém as FRs desejadas da presente invenção. Em uma modalidade, o constructo gênico que codifica o anticorpo caracterizado inclui, na orientação de 5' para 3', um segmento de DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada, que inclui pelo menos uma FR humanizada dentro dela, e um segmento de DNA que codifica uma região constante de cadeia pesada. Em outra modalidade, outro segmento do DNA que codifica uma citocina é fundido à extremidade 3' do segmento de DNA que codifica a região constante de cadeia pesada. Em uma modalidade diferente, o constructo gênico inclui, na orientação de 5' para 3', um segmento de DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada, que inclui pelo menos uma FR humanizada e um segmento de DNA que codifica uma citocina. Alternativamente, um ácido nucléico da invenção pode incluir, na orientação de 5' para 3', um segmento de DNA que codifica uma região variável de cadeia leve, que inclui pelo menos uma FR humanizada dentro dela e um segmento de DNA que codifica uma citocina. Em algumas modalidades, um ácido nucléico que codifica uma citocina está unido na estrutura à extremidade 3' de um gene que codifica uma região constante (como por exemplo, éxon CH3), seja diretamente ou através de uma região intergênica (como por exemplo, por ligantes apropriados, tal como pelo DNA que codifica (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 3)).

II. Expressão de Constructos do Anticorpo hu14.18

[0059] As proteínas que codificam ácidos nucléicos da presente invenção podem ser montadas ou inseridas em um ou mais vetores de expressão para introdução em uma célula receptora apropriada, onde elas serão expressadas. A introdução de ácidos nucléicos em vetores de expressão pode ser realizada por técnicas de biologia molecular padronizadas. Os vetores de expressão preferidos incluem aqueles a

partir dos quais a proteína codificada pode ser expressada em células de bactérias ou mamíferos.

[0060] De acordo com a invenção, uma cadeia pesada de uma região variável do anticorpo é, de preferência, co-expressada na mesma célula com uma cadeia leve correspondente. No caso de proteínas de fusão que compreendem múltiplas cadeias de polipeptídeos, mais do que um vetor de expressão pode ser usado. Os métodos de co-transfecção que usam, por exemplo, dois vetores de expressão, resultam freqüentemente em ambos vetores serem distribuídos para uma célula-alvo. Alternativamente, alguma vezes é útil usar um único vetor que codifica uma pluralidade de polipeptídeos para co-expressão na mesma célula.

[0061] Por exemplo, as Figuras 2A-D ilustram a seqüência de ácidos nucléicos de um único vetor que codifica as cadeias pesada e leve de uma imunoglobulina de acordo com a invenção. O vetor inclui também um ácido nucléico que codifica IL-2 fundida à extremidade 3' da cadeia pesada de imunoglobulina. Assim sendo, quando introduzido em uma célula, este vetor sozinho pode fornecer uma proteína de fusão anticorpo-IL-2 humanizada que se liga especificamente a GD2 e estimula uma função imune.

[0062] Além disso, pode ser conveniente expressar as proteínas da presente invenção como moléculas de cadeia única. Por exemplo, uma região variável do anticorpo pode ser expressada como um anticorpo de cadeia única ou sFv fundida opcionalmente a uma proteína diferente de imunoglobulina. Em outra modalidade, uma cadeia pesada (com ou sem uma citocina fundida) é combinada com uma contra-parte de cadeia leve (ou pesada) (com ou sem uma citocina fundida), para formar imunocjugados monovalentes e divalentes.

[0063] As linhagens de células receptoras são, de preferência, células linfóides, tal como um mieloma (ou hibridoma). Os mielomas

podem sintetizar, montar e secretar imunoglobulinas codificadas por genes transfectados e podem glicosilar proteínas. Uma célula receptora particularmente preferida é o mieloma Sp2/0, que normalmente não produz imunoglobulina endógena. Quando transfectada, a célula produzirá apenas imunoglobulinas codificadas pelos constructos gênicos transfectados. Os mielomas transfectados podem ser desenvolvidos em cultura ou nos peritônios de camundongos, onde os imunocombinados secretados podem ser recuperados a partir do líquido ascítico. Outras células linfóides, tais como linfócitos B, também podem ser usadas como células receptoras.

[0064] Há vários métodos para transfectar células linfóides com vetores que contêm os constructos de ácidos nucleicos que codificam a cadeia de Ig quimérica. Uma maneira preferida de introduzir um vetor em células linfóides é por fusão de esferoblastos (vide, por exemplo, Gillies *et al.*, *Biotechnol.* 7:798-804 (1989)). Os métodos alternativos incluem eletroporação ou precipitação com fosfato de cálcio. Outros métodos úteis para produzir os imunocombinados incluem a preparação de uma seqüência de RNA que codifica o constructo e sua translação em um sistema *in vivo* ou *in vitro* apropriado. Uma vez expressadas, as proteínas da invenção podem ser colhidas por procedimentos de purificação de proteínas padronizados (vide, por exemplo, patente nº US 5.650.150).

III. Tratamento de Câncer por Terapia Gênica

[0065] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser usados como agentes de terapia gênica, para o tratamento de câncer e outras doenças nas quais é desejável direcionar o sistema imunológico para um tipo específico de célula. Por exemplo, as células podem ser retiradas de um ser humano ou animal, e um ou mais ácidos nucleicos que codificam um anticorpo da presente invenção podem ser transfectados para dentro das células. As células são então reintroduzidas no ser hu-

mano ou animal. As células transfectadas podem ser células normais ou cancerosas. Alternativamente, um ácido nucléico pode ser introduzido nas células *in situ*. O ser humano ou o animal monta então uma resposta imune para as células cancerosas, que pode curar ou diminuir a gravidade do câncer. Uma região variável do anticorpo da invenção, acoplada a elementos reguladores apropriados para promover a expressão em células de mamíferos, pode ser transfectada para dentro das células por qualquer uma de uma série de técnicas, incluindo por intermédio de fosfato de cálcio, uma "pistola de gene", vetores de adenovírus, lipossomas catiônicos, vetores retrovirais, ou qualquer outro método de transfecção eficiente.

[0066] Em uma modalidade específica da invenção, um anticorpo hu14.18 é usado para distribuir seletivamente uma citocina para uma célula-alvo *in vivo*, de tal modo que a citocina possa exercer um efeito biológico localizado, tal como uma resposta inflamatória local, uma estimulação do crescimento e ativação de células T, ou uma atividade de ADCC. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo é administrada dentro do sistema circulatório de um indivíduo que abriga a célula-alvo.

[0067] A invenção será ilustrada adicionalmente pelos exemplos não limitativos que se seguem.

Exemplos

Exemplo 1

Purificação e Formulação de hu14.18-IL2

[0068] Em um estudo, hu14.18-IL2 foi expressado a partir de células NS/0, o sobrenadante da cultura das células foi colhido, e a proteína de hu14.18-IL2 foi purificada, usando, seqüencialmente, cromatografia de coluna de Resina Mista Abx, cromatografia de Proteína A recombinante, e cromatografia de coluna de Q Sepharose, e em seguida, diafiltração de fluxo tangencial Pellicon 2 para troca de tampão pa-

ra tampão de formulação. Os detalhes destas etapas de purificação estão descritos abaixo. As etapas de inativação e remoção do vírus foram interdigitadas nestas etapas como descritas abaixo. As etapas de inativação e remoção do vírus não foram necessárias para a purificação em si, mas foram usadas para satisfazer condições normativas.

[0069] Dois litros de sobrenadante da cultura tecidual de NS/0, contendo hu14.18-IL2 tiveram seu pH ajustado para 5,9 com ácido acético 1 M, e foram aplicados em uma coluna Abx (J. T. Baker); lavou-se com MES 10 mM, acetato de sódio 100 mM, pH 6,2; e eluiu-se com acetato de sódio 500 mM, pH 7. Este material foi carregado em uma coluna de Proteína A recombinante (Pharmacia); lavou-se com fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7; lavou-se com fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 6; lavou-se com fosfato de sódio 10 mM pH 7; e eluiu-se com fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 3,5. O pH do material eluído era 4,2. Para promover a inativação do vírus, este pH foi reduzido para 3,8 e a preparação foi incubada por 30 min, e depois disso, o pH foi neutralizado até 7 com NaOH 1 M. Para remover o ácido nucléico, este material foi carregado em uma coluna Q Sepharose (Pharmacia) e lavado com fosfato de sódio 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7. O ácido nucléico ligou-se à coluna, enquanto que a proteína foi encontrada no fluxo que atravessou e nas lavagens, que foram repetidas até que A280 voltasse para o valor referencial. A diafiltração por Pellicon 2 (Millipore) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, de tal modo que o material final de hu14.18-IL2 fosse colocado na seguinte formulação:

1. Manitol	4%
2. Cloridrato de arginina USP/NF	100 mM
3. Ácido cítrico USP-FCC	5 mM
4. Polysorbate 80	0,01% (p/v)

[0070] O pH do tampão de formulação foi ajustado para 7 com

NaOH 1 M.

[0071] Como etapa final, a preparação foi filtrada através de uma membrana Viresolve 180 (Millipore), que tem um corte de peso molecular de 180.000 daltons. Isto teve o efeito de "arrematar" o material, de tal modo que, como resultado, os dímeros agregados e oligômeros de ordem mais alta fossem removidos.

Exemplo 2

Atividade Antitumoral da Proteína de Fusão hu14.18-IL-2 Observada em Ensaio Clínico Fase I

[0072] Para avaliar a segurança e a eficácia de hu14.18-IL-2, um ensaio clínico Fase I foi realizado. Os pacientes elegíveis tinham melanoma confirmado por histologia, que foi considerado cirurgicamente e medicamente incurável. Estes pacientes podiam ter doença metastática mensurável ou avaliável, ou eles podiam não ter qualquer evidência de doença após ressecção cirúrgica de metástases distantes ou doença recorrente regional. Os pacientes com múltiplas (duas ou mais) recorrências locais ou regionais foram incluídos apenas se eles tivessem evidência anterior do envolvimento de linfonodos e se cada recorrência tivesse ocorrido em um espaço de tempo de pelo menos 2 meses. Todos os pacientes tinham de ter função adequada da medula óssea (definida por leucócitos totais (WBC) > 3.500/mL, ou granulócitos totais > 2.000/mL, plaquetas > 100.000/mL, e hemoglobina > 10,0 g/dL), função hepática adequada (definida por uma aspartato aminotransferase (AST) < 3 x o nível normal, e uma bilirrubina total < 2,0 mg/dL), e função renal adequada (definida por creatinina sérica < 2,0 mg/dL ou depuração de creatinina > 60 mL/min). Todos os pacientes tinham um estado funcional por eletrocorticografia (ECOG) de 0 ou 1 e uma expectativa de vida de pelo menos 12 semanas. Os pacientes que tinham recebido anteriormente quimioterapia, terapia com radiação, ou outra terapia imunossupressora dentro de 4 semanas antes do

estudo foram excluídos. Os pacientes podiam ter tido metástases no sistema nervoso central (SNC), caso tratadas e estáveis por pelo menos 4 semanas antes de iniciar o estudo. Obteve-se consentimento por escrito por parte de todos pacientes.

[0073] Este ensaio Fase I foi designado como um estudo aberto, não-aleatório e com escalonamento da dose, no qual grupos de 3 a 6 pacientes receberam hu14.18-IL-2 em um dos seguintes níveis de dose: 0,8, 1,6, 3,2, 4,8, 6,0 ou 7,5 mg/m²/dia. O hu14.18-IL-2 foi administrado aos pacientes internados como uma infusão intravenosa (IV) de 4 horas por 3 dias consecutivos durante a primeira semana de cada curso de tratamento. A proteína de fusão hu14.18-IL-2 foi administrada aos pacientes em uma formulação que compreendia 4% de manitol; cloridrato de arginina, 100 M; citrato, 5 mM; e 0,01% de Tween 80, em pH 7. Os pacientes receberam alta do hospital, caso estáveis, aproximadamente 24 horas depois de completada a terceira infusão. Eventos adversos e toxicidades foram pontuados conforme os critérios de toxicidade "NCI Common Toxicity Criteria" (versão 2.0) e da "University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center Toxicity Grading Scale" para IL-2 (estado funcional, ganho de peso, e temperatura). A toxicidade limitante da dose (DLT) foi definida como a ocorrência de toxicidade grau 3 ou 4 que não linfopenia grau 3, hiperbilirrubinemia, hipofosfatemia ou hiperglicemia. A dose máxima tolerada (MTD) foi definida como o nível da dose no qual dois entre seis pacientes tiveram toxicidade limitante da dose (DLT) durante o curso 1 do tratamento. Os pacientes com toxicidades grau 3 relacionadas ao tratamento foram deixados recuperar até pelo menos grau 1 antes de poder retomar o tratamento com uma redução de 50% na dose para o curso 2 do tratamento. Os pacientes com progressão da doença $\geq 25\%$ foram removidos do estudo. Os pacientes com doença estável receberam a administração do curso 2 do tratamento.

[0074] As propriedades farmacocinéticas de hu14.18-IL-2 foram avaliadas nos pacientes. Quando os níveis de hu14.18-IL-2 foram avaliados em amostras seriais de todos 33 pacientes imediatamente após a primeira infusão de 4 horas (dia 1, curso 1), a meia-vida demonstrou ser 3,7 h (\pm desvio padrão (SD) de 0,9 h). Este é um valor intermediário entre as meias-vidas de seus 2 componentes (aproximadamente 45 min para IL-2 e 3 dias para o anticorpo quimérico m14.18), e comparável àquele que foi observado para a meia-vida de m14.18-IL-2 quimérico em camundongos. Após a depuração do hu14.18-IL-2 do soro destes pacientes, nem IL-2 nem os componentes do anticorpo hu14.18 puderam ser detectados. O pico no soro e a área sob a curva (AUC) durante o curso do tratamento 1 apresentaram um aumento dependente da dose significativo ($p < 0,001$).

[0075] Trinta e três pacientes foram tratados neste estudo. A Tabela 1 lista os resultados clínicos. Dois pacientes (6%) completaram apenas os 2 primeiros dos 3 dias do curso 1. Um destes pacientes (nível de dose 3) teve hiperbilirrubinemia grau 3 no dia 2 do tratamento, e o outro paciente (nível de dose 6) teve hipoxia e hipotensão grau 3, requerendo tratamento para ser mantido. Estes dois pacientes tiveram progressão da doença e não receberam um segundo curso de terapia. Dezenove pacientes (58%) mantiveram a doença estável após o primeiro curso da terapia e receberam um segundo curso da terapia. Cinco pacientes (15% de todos pacientes) requereram uma redução de 50% da dose para o curso 2, secundária a eventos adversos no curso 1. Dezesete pacientes (52% de todos pacientes) completaram o curso 2. Um paciente (nível de dose 4) declinou em receber a infusão final durante o curso 2, e um paciente (nível de dose 6) teve a infusão final durante o curso 2 suspensa devido à hipotensão. Oito pacientes (24% de todos pacientes) mantiveram a doença estável após o segundo curso de tratamento. Os resultados indicam que hu14.18-IL-2

causou estabilização da progressão da doença em um número surpreendentemente alto de pacientes.

[0076] Oito entre os 33 pacientes mantiveram a doença estável depois de 2 cursos de terapia, e 4 destes 8 pacientes continuam com nenhuma evidência de doença progressiva (1 com doença estável e 3 com nenhuma evidência de doença) por 20-52 meses desde completarem a terapia do protocolo.

[0077] Cinco dos 33 pacientes entraram no estudo com nenhuma doença mensurável após ressecção cirúrgica de recorrências ou metástases. Dois destes cinco pacientes tiveram progressão da doença, enquanto que os 3 pacientes remanescentes continuaram com nenhuma evidência de doença (20-52 meses). Estas descobertas são consistentes com a hipótese de que o benefício clínico de uma intervenção imunoterapêutica é mais possível de ocorrer em um paciente com uma baixa carga tumoral. Um paciente adicional teve um decréscimo objetivo em um nódulo pulmonar após dois cursos de terapia, mas a resposta global da doença foi pontuada como progressão da doença devido ao crescimento em um nodo distante. O nodo foi ressecado após a terapia com hu14.18-IL-2 e o paciente permaneceu livre da progressão da doença por mais de 3 anos.

Tabela 1

Resultados Clínicos

	Número de Pacientes
Pacientes que completaram o curso 1	31
Doença estável após curso 1	19
Redução de 50% da dose para o curso 2	5
Pacientes que completaram o curso 2	17
Doença estável após curso 2	8

Imunoestimulação *in vivo* por hu14.18-IL-2 em um Ensaio Clínico Fase

!

[0078] Os pacientes tratados com hu14.18-IL-2 foram examinados também quanto a indicações de imunoestimulação. Uma linfopenia do sangue periférico ocorreu nos dias 2-4, e seguiu-se um rechaço de linfocitose nos dias 5-22. Estas duas mudanças eram dependentes da dose ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). As contagens de linfócitos nos dias 5, 8, 15 e 22 foram significativamente maiores do que o referencial para o curso 1. A contagem referencial de linfócitos para o curso 2 (dia 29 do curso 1) foi aumentada sobre a contagem referencial de linfócitos para o curso 1, indicando que os efeitos do primeiro curso de tratamento ainda estacam presentes no dia 29. Além disso, as contagens de linfócitos durante o curso 2 nos dias 5, 8 e 15 são maiores do que os valores correspondentes para os dias 5, 8 e 15 durante o curso 1 para estes 12 pacientes.

[0079] O fenótipo da superfície das células linfáticas apresentou uma expansão de linfócitos CD16+ e CD56+ (marcadores de células exterminadoras naturais (NK)) após a primeira semana da terapia com hu14.18-IL-2. Este efeito ainda estava presente no dia 29 do curso 1 (dia 1, curso 2). Para os pacientes 19-33 (que receberam 4,8-7,5 mg/m²/dia), o fenótipo da superfície das células linfáticas foi determinado nos dias 15 e 22 além dos dias 1 e 8. Esta análise demonstrou que o aumento de células que co-expressam CD56 e CD56/CD16 permaneceu significativamente elevado ($p < 0,01$) nos dias 8, 15 e 22.

[0080] Como uma medida de imunoativação, foram obtidos os níveis de proteína C reativa (CRP) para os pacientes 13-33 e os níveis do receptor de IL-2 solúvel (sIL-2R) para os 31 pacientes que completaram o curso 1. Um aumento significativo na CRP média estava presente nos dias de tratamento 3-5 no curso 1 e também no curso 2, em comparação com o referencial para cada curso. Este aumento em CRP retornou aos níveis referenciais no dia 8 de cada curso de tratamento. O nível de sIL-2R foi aumentado significativamente sobre o re-

ferencial, iniciando 24 após a infusão de hu14.18-IL-2 durante o curso 1 e também no curso 2, que persistiu até o dia 8. O aumento em sIL-2R demonstrou ser dependente da dose ($p = 0,014$). Os valores de sIL-2R para o curso 2 foram aumentados em comparação com os valores correspondentes no curso 1 para os dias 1-5, para os pacientes que receberam a mesma dose em ambos cursos ($p < 0,05$).

[0081] A linhagem de células de neuroblastoma LA-N-5, que expressa GD2 e se liga a hu14.18-IL-2, foi usada para avaliar a função de células exterminadoras naturais (NK) ativadas por IL-2 e a citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 31 pacientes que completaram o curso 1. Não houve um aumento significativo na extinção mediada por linfócitos a partir do dia 8, quando comparado com o dia 1 para estes dois ensaios. Os 12 pacientes que receberam o curso 2 na mesma dose que no curso 1 apresentaram resultados de ADCC que foram muito similares àqueles obtidos durante o curso 1. O único parâmetro que demonstrou ser diferente no curso 2 em relação ao curso 1 foi a extinção aumentada na presença de IL-2 no dia 1, indicando que a extinção aumentada neste ensaio permaneceu elevada no dia 29 (dia 1, curso 2).

[0082] Devido ao fato de que o alvo LA-N-5 é relativamente resistente a células NK recentes, ele é útil para medir a extinção aumentada de IL-2, e ADCC. Entretanto, a fraca extinção de LA-N-5 mediada por PBMCs recentes no meio (sem IL-2 suplementar *in vitro*) não foi significativamente maior no dia 8 do que no dia 1.

[0083] Para os pacientes 19-33, foram realizados ensaios de NK padronizados nos dias 1, 8, 15 e 22, usando a linhagem de células-alvo K562 suscetíveis a NK. Um aumento significativo na lise de células-alvo K562 por NK, quando testadas em meio ou na presença de IL-2, foi observado nos dias 8 e 22, quando comparado com o dia 1. As

amostras do soro de pacientes selecionados também foram avaliadas para determinar a atividade funcional de IL-2 e o anticorpo funcional anti-GD2.

[0084] A linhagem de células Tf-1b responsiva a IL-2 demonstrou que IL-2 induziu a proliferação com o soro dos pacientes obtido após a infusão de hu14.18-IL-2. Observou-se um aumento progressivo na proliferação durante as primeiras 4 horas após a infusão de 4 horas. Os valores retornaram para o valor referencial em 16 horas após esta infusão, o que é consistente com a meia-vida sérica para hu14.18-IL-2 de aproximadamente 4 horas. As amostras do soro nestes pontos no tempo também foram examinadas por citometria de fluxo quanto à presença da imunocitocina (IC) de hu14.18-IL-2 que retém seu componente IL-2 e sua atividade do anticorpo anti-GD2. hu14.18-IL-2 capaz de ligar-se à linhagem de células M21 (GD2-positivas) foi detectável em amostras do soro dos pacientes após uma infusão de imunocitocina (IC). A quantidade de IC capaz de ligar-se a M21 aumentou progressivamente durante as primeiras 4 horas após a infusão de 4 horas, e diminuiu após este tempo, o que é novamente consistente com a meia-vida de aproximadamente 4 h. Finalmente, ensaios *in vitro* foram realizados com espécimes de pacientes, para determinar se a administração de hu14.18-IL-2 resulta em condições *in vivo* consistentes com aquelas necessárias para atingir a citotoxicidade celular dependente do anticorpo (ADCC). As PBMCs do dia 8 apresentaram ADCC aumentada em células-alvo GD2+ quando hu14.18-IL-2 é adicionado ao ensaio citotóxico. Este mesmo ensaio de ADCC foi realizado com PBMCs do dia 8; entretanto, em vez de adicionar hu14.18-IL-2 ao ensaio, o soro do paciente, obtido antes ou depois da administração de hu14.18-IL-2, foi adicionado. As PBMCs obtidas dos pacientes no dia 8 do curso 2 foram capazes de mediar a exterminação aumentada da linhagem de células LA-N-5 na presença do soro obtido após a ad-

ministração de hu14.18-IL-2, comparado com aquela observada com o soro obtido antes da infusão. Assim sendo, o hu14.18-IL-2 que circula nos pacientes depois da administração intravenosa é capaz de facilitar a ADCC com PBMCs ativadas *in vivo* por hu14.18-IL-2 desse mesmo paciente.

[0085] Resumindo, estes resultados indicam que houve mudanças imunológicas associadas a esta terapia com hu14.18-IL-2, inclusive um aumento na contagem de linfócitos, um aumento na porcentagem de PBMCs CD16+ e CD56+, um aumento na lise por NKs, e um aumento na ADCC. Uma evidência adicional quanto à imunoativação incluiu um aumento nos níveis séricos de CRP e de sIL-2R. Análises laboratoriais do soro e de PBMCs indicaram que a molécula de hu14.18-IL-2 em circulação no soro dos pacientes após a administração intravenosa conservou sua capacidade de ativar células responsivas a IL-2 através do receptor de IL-2 e conservou sua capacidade de ligar-se a células tumorosas GD2-positivas, e distribuir IL-2 para sua superfície, como detectado por citometria de fluxo. As células NK foram ativadas *in vivo* em função da sua capacidade de mediar a função de NKs e ADCC *in vitro*. Além disso, as células NK ativadas *in vivo* pelo hu14.18-IL-2 administrado a estes pacientes foram capazes de mediar a ADCC facilitada pelo hu14.18-IL-2 circulante no soro destes mesmos pacientes. Assim sendo, as condições para atingir a imunoativação foram alcançadas em todos os pacientes neste estudo.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína de fusão de anticorpo-IL2 designada como hu14.18-IL2, caracterizada pelo fato de que compreende a cadeia leve de SEQ ID NO:5 e a cadeia pesada de SEQ ID NO: 6, em que a referida proteína de fusão liga-se especificamente a GD2 e estimula função imune.

2. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 4 contendo as sequências de ácido nucleico que codificam a proteína de fusão como definida na reivindicação 1.

3. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende a proteína de fusão como definida na reivindicação 1 e um veículo ou excipiente farmacêutico.

4. Uso da proteína de fusão como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para estabilizar a progressão da doença em doentes com câncer positivo para GD2.

5. Uso da proteína de fusão como definida na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de um medicamento para aumentar a atividade de ADCC e de lise NK-em doentes com câncer positivo para GD2.

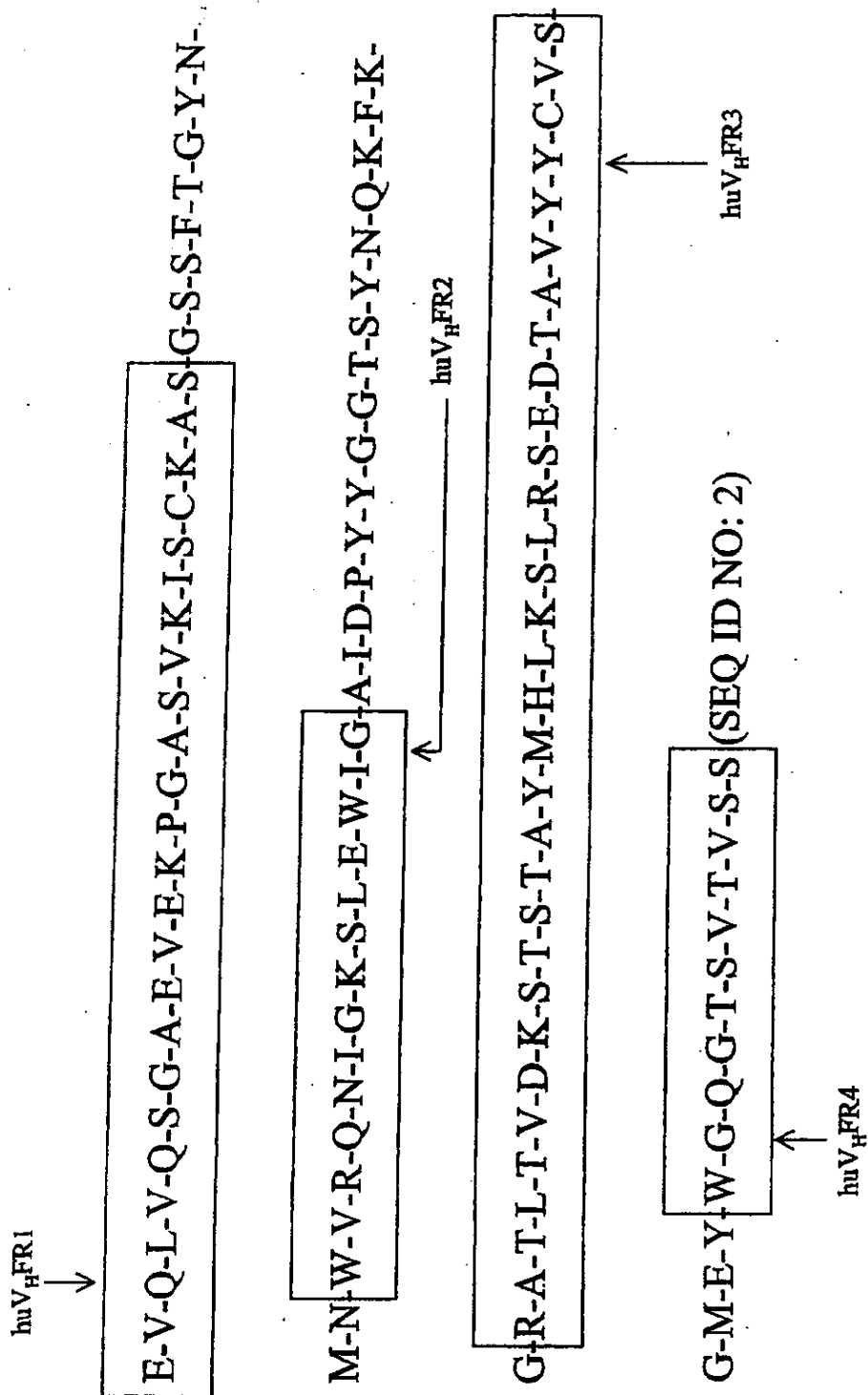



FIG. 1B

10373757

GTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCAT
ATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC
GCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA
CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTAT
GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCAATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTG
GCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGGA
CGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAATGTCGTAACAACCTCCGC
CCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGGCTCTCTGGC
TAACTACAGAACCCACTGCTTAACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCTC
TAGAATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTCTGGTGAGGAGAGAGGGAA
GTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGAGCAGGAGCACTGAATCCCATTTGCTCATTCCATGTATCTGGC
ATGGGTGAGAAGATGGGTCTTATCCTCCAGCATGGGGCCTCTGGGGTGAATACTTGTAGAGGGGA
GGTCCAGATGGGAACATGTGCTATAATGAAGATTATGAAATGGATGCCTGGGATGGTCTAAGTA
ATGCCTTAGAAGTACTAGACACTTGAATTCACTTTTTTTGGTAAAGAAGAGATTTTAGGCTATA
AAAAAATGTTATGTAATAAATAACGATCACAGTTGAAATAAAAAAATAAGGATTAAGGATTCATG
AATTTTGTGTATAACTATGTATTTCTCTCTCATTGTTTCAGCTTCTTAAGCGACGTGGTGATGACC
CAGACCCCTGTCCCTGCCCGTGACCCCGGGGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCAGATCTAGTCAG
AGTCTTGTACACCGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCA
AAGCTCCTGATTACAAAAGTTTCCAACCGATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGA
TCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTATTTCTGT
TCTCAAAGTACACATGTTCTCCGCTCAGTTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTATT
AGTGTGTACAGGTTTCAAGAGGGACTAAAGACATGTCAGCTATGTGTGACTAATGGTAATGTT
ACTAAGCTGCGGGATCCCGCAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCT
AAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGCTGCAAAGAGCT
CCAACAAAACAATTTAGAATTTATTAAGGAATAGGGGGAAGCTAGGAAGAAACTCAAACATCA
AGATTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTATAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTCTGTCT
GTCCCTAACATGCCCTGTGATTATCCGCAAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAAC
ACCATCCTGTTTCTTCTTCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCTCCCGCCATCTG
ATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATACTTCTATCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAG
CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTACAAAAGAGC
TTCAACAGGGGAGAGTGTAGAGGGAGAAGTGCACCCCTGCTCCTCAGTTCAGCCTGACCCCT
TCCCATCCTTTGGCTCTGACCCTTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCGGTCTCCAGCTCAT
CTTTCACTCACCCCCCTCCTCCTTGGCTTAAATTATGCTAATGTTGGAGGAGAATGAATAAAT
AAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTCTTCTCAATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTACCA
ACTACTCAATTTCTTATAAGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAA
AATCATCCTTATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCTCCTCAAACCCACAAGCC
TTCTGTCTCAGTCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGTCTCCTTGTGTTTCCCTCCTCAGCA
AGCCCTCATAGTCTTTTAAAGGTGACAGGTCTTACGGTCATATATCCTTTGATTCAATTCCTGG
GAATCAACCAAGGCAAATTTTCAAAAAGAAGAACCTGCTATAAAGAGAATCATTCAATTGCAACA
TGATATAAATAACAACACAATAAAAGCAATTAATAAACAACAATAGGGAAATGTTAAGTTC
ATCATGGTACTTAGACTTAAATGGAATGTATGCCCTTATTACATTTTAAACAGGTAAGGGGAC
TCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTCCACAACCTAATTTAATCCACACTATACTGTGAG
ATTAAAAACATTCAATTAATGTTGCAAAGGTTCTATAAAGCTGAGAGACAAATATATTCTATAAC
TCAGCAATCCCACTTCTAGGGTCGATCGACGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGG
CCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGC
AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC

FIG. 2A

1017375 

CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATCGCTATTACCATGGTGTATGCGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACAAAATCAAACGG
GACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTG
GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTACAGAACCCACTGCTTAACTGGCTTATCGAAA
TTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTCCTCGAGGCTAGAATGAAAGTTGCCTGTTAGGCTG
TTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGGTGAGGAGAGAGGGAAAGTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGA
GCAGGAGCACTGAATCCCATTTGCTCATTCCATGTATCTGGCATGGGTGAGAAGATGGGTCTTATCC
TCCAGCATGGGGCCTCTGGGGTGAATACTTGTAGAGGGAGGTTCCAGATGGGAACATGTGCTAT
AATGAAGATTATGAAATGGATGCCTGGGATGGTCTAAGTAATGCCCTAGAAGTGAAGTACTAGACACTT
GCAATTCACTTTTTTGGTAAGAAGAGATTTTTAGGCTATAAAAAAATGTTATGTAATAAAATAAACG
ATCACAGTTGAAATAAAAAAATAAAGGATGTTTCATGAAATTTGTGTATAACTATGTATTTCT
CTCTCATTGTTTCAGCTTCCCTAAGCGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTTGGAGAAGC
CCGGCGCTCCGTGAAGATCTCTGCAAGGCTCCGGCTCCCTCCTCACCGGCTACAACATGAACT
GGGTGCGCCAGAACATCGGCAAGTCCCTGGAGTGGATCGGCGCCATCGACCCCTACTACGGGCGC
ACCTCCTACAACCAAGATTCAAGGGCCGCGCCACCCCTGACCGTGGACAAGTCCACCTCCACCGC
CTACATGCACCTGAAGTCCCTGCGCTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGTGTCCGGCATGGA
GTACTGGGGCCAGGGCACCTCCGTGACCGTGTCTCCGGTAAGCTTTCTGGGGCAGGCCAGGCCCT
GACCTTGGCTTTGGGGCAGGGAGGGGGCTAAGGTGAGGCAGGTGGCGCCAGCCAGGTGCACACCC
AATGCCATGAGCCCAGACACTGGAAGCTGAACTCGCGGACAGTTAAGAACCCAGGGCCCTCTG
CGCCCTGGGCCAGCTCTGTCCACACCGCGGTACATGGCACCACTCTCTGACGCTCCACCA
AGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCAOCTCTCCAAGAGCACTCTGGGGGCACAGCGCCCTGG
GCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCA
GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAAC
ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGGTGAGAGGCCAGCACAGGGAGGGAGGGTGTCTGTGGAAGCC
AGGCTCAGCGCTCCTGCCTGGACGCTCCCGGTATGCAAGTCCCAAGGCGGACAGGTGAGTGGCAGG
CCCCGTCTGCCTCTTCAACCGGAGGCCCTCTGCCCGCCCCACTCATGCTCAGGGAGAGGGTCTTCTG
GCTTTTTCCAGGCTCTGGGCAGGCACAGGCTAGGTGCCCTAACCCAGGCCCTGCACACAAAGG
GGCAGGTGCTGGGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCTGAOCTAAGCC
CACCCAAAAGGCCAACTCTCCACTCCCTCAGCTCGGACACCTTCTCTCTCCAGATTCCAGTAA
CTCCCAATCTTCTCTCTGACAGGCCAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCACCGTGGCCAG
GTAAGCCAGCCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTGAGATGACTCATC
CAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACACGTCCACCTCCATCTTCTCTCAGCACTGAACTCCT
GGGGGGACCGTCACTCTCTCTTCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCOCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA
CCGTGTGGTCAAGGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA
AGGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGTGGGACC
CGTGGGGTGGAGGGCCACATGGACAGAGGGCCGGCTCGGCCACCCCTCTGCCTGAGAGTGACCG
CTGTACCAACCTCTGTCCCTACAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCAC
GGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACACTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGT
GGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACACTACACGACAGAAAGGCTCT
CCCTGTCCCCGGTAAAGCCCCAATTCAAGTTCTACAAAAGAAAACACAGCTGCAACTGGGACAT
CTCTGTGGATCTCCAGATGATTCTGAATGGAATTAACAACACTACAAGAATCCAAAATCACCAGG
ATGCTCACATTCAAGTTCTACATGCCAAGAAGGCCACAGAGCTCAAACATCTCCAGTGTCTAGAG
GAGGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAACCTCGCTCAGAGCAAAAATTCACCTTAAGACC
TAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACATAAGGGATCCGAAAACAACATCA
TGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGT

FIG. 2B

59

AAAGCATCATCTCAACACTAACTTGATAATTAAGTGCTCGAGGGATCCAGACATGATAAGATACA
TTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG
ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCAATTAGAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTC
ATTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAAT
GTGGTATGGCTGATTATGATCCTGCCTCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACAT
GCAGCTCCCGGAGACGGTCAACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGG
GCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGA
GTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCAACCATATGCGGTGTG
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTG
ACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGT
TATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCAG
GAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAA
AAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCC
CTGGAAGCTCCCTCGTGGCGTCTCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCT
CCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTT
CGTCCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC
TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCAATGGCCAGCAGCCATGTTAACAGG
ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAAGTGGTGGCTAACTACGGCTA
CACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG
TAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGAT
TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
GAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCT
TTAAATTAATAAATGAAAGTTTTAAATCAATCTAAAATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTA
CCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCACTAGTTGCCTGA
CTCCCCGTGTTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA
CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTOCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGA
GCGCAGAAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG
AGTAAGTAGTTCCGAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCCTGGTGTG
CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTCGGTCCTCOGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTGGC
CGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATTCTTACTGTCAAGCCATGCGTAAGA
TGTTTTCTGTGACTGGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGT
TGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATC
ATTGAAAAAGTTCCTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCGATG
LAACCACTCGTGCAACCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACCGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGTATTTAGAAAAATAACAATAAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGA
CGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTG
TCTTCAAGAATCCGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAACTAGA
ATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATAGAA
GCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAAGGGGAGGTGT
GGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCTGATTATGATCTAAAGCCAG
CAAAAGTCCCATGGTCTTATAAAAAATGCATAGCTTTCCGAGGGGAGCAGAACTTGAAGCATC
TTCTGTTAGTCTTTCTCTCGTAGACCTTAAATTCATACTTGATTCTTTCTCTCTGGACCTCAG
AGAGGACGCTGGGTATTCTGGGAGAAGTTTTATTTCCCAAAATCAATTTCTGGGAAAAACGTTG
CACTTTCAAATTCCTGCATGATCCTTGTCAAAAGAGTCTGAGGTGGCCTGGTTGATTCATGGCTTC
CTGGTAAACAGAACTGCCTCCGACTATCCAAACCATGTCTACTTTACTTGCCAATTCGGTTGTTCA
ATAAGTCTTAAAGGCATCAACAACTTTTGGCAAAGAAAATGAGCTCCTCGTGGTGGTCTTTGAGT
TCTCTACTGAGAACTATATTAATCTGTCTTAAAGGTCGATTCTTCTCAGGAATGGAGAAACAG

FIG. 2C

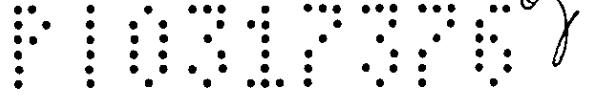
GTTCCTACCCATAATCACCAGATTCTGTTTACCTTCCACTGAAGAGGTTGTGGTCATTCTTTGGA
AGTACTTGAACCTCGTTCCTGAGCGGAGGCCAGGGTCGGTCTCCGTTCTTGCCAATCCCCATATTTG
GGACACGGCGACGATGCAGTTCAATGGTCGAACCATGAGGGCACCAAGCTAGCTTTTTGCAAAG
CCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGCGGCCTGGCC
TCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGGCGGAGAATGGGCGGAACTGGGCGGAGTTAG
GGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCITTGCA
TACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGC
TTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACA
(SEQ ID NO: 4)

FIG. 2D

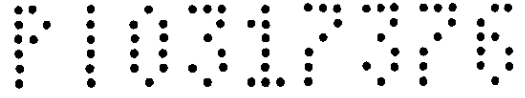
D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-N-G-N-T-Y-
L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-T-
D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-
L-K-R-T-V-A-A-P-S-V-F-I-F-P-P-S-D-E-Q-L-K-S-G-T-A-S-V-V-C-L-L-N-N-F-Y-P-R-
E-A-K-V-Q-W-K-V-D-N-A-L-Q-S-G-N-S-Q-E-S-V-T-E-Q-D-S-K-D-S-T-Y-S-L-S-S-T-
L-T-L-S-K-A-D-Y-E-K-H-K-V-Y-A-C-E-V-T-H-Q-G-L-S-S-P-V-T-K-S-F-N-R-G-E-C

(SEQ ID NO: 5)

FIG. 3A



E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-N-M-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G
A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S
G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S-A-S-T-K-G-P-S-V-F-P-L-A-P-S-S-K-S-T-S-G-G-T-A-A-L-G-C-L-V-K-D-Y-F-P-
E-P-V-T-V-S-W-N-S-G-A-L-T-S-G-V-H-T-F-P-A-V-L-Q-S-S-G-L-Y-S-L-S-S-V-T-V-P-S-S-S-L-G-T-Q-T-Y-I-C-N-
V-N-H-K-P-S-N-T-K-V-D-K-R-V-E-P-K-S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V-F-L-F-P-P-K-P-K-D-T-L-
M-I-S-R-T-P-E-V-T-C-V-V-D-V-S-H-E-D-P-E-V-K-F-N-W-Y-V-D-G-V-E-V-H-N-A-K-T-K-P-R-E-B-Q-Y-N-S-T-Y-
R-V-V-S-V-L-T-V-L-H-Q-D-W-L-N-G-K-E-Y-K-C-K-V-S-N-K-A-L-P-A-P-I-E-K-T-I-S-K-A-K-G-Q-P-R-E-P-Q-V-Y-
T-L-P-P-S-R-E-B-M-T-K-N-Q-V-S-L-T-C-L-V-K-G-F-Y-P-S-D-I-A-V-E-W-B-S-N-G-Q-P-E-N-N-Y-K-T-T-P-P-V-L-D-
S-D-G-S-F-F-L-Y-S-K-L-T-V-D-K-S-R-W-Q-Q-G-N-V-F-S-C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q-K-S-L-S-L-S-P-G-A-P-
T-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-L-L-D-L-Q-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-R-M-L-T-F-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-
E-L-K-H-L-Q-C-L-B-E-B-L-K-P-L-E-B-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-L-R-P-R-D-L-I-S-N-I-N-V-I-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-
F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-C-Q-S-I-S-T-L-T (SEQ ID NO: 6)



69

FIG. 3B