

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.11.29	(73) Titular(es): AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH STAFFELSEESTRASSE 2 81477 MÜNCHEN DE
(30) Prioridade(s): 2005.12.16 EP 05027606 2006.03.01 EP 06004144	(72) Inventor(es): PETER KUFER DE MATTHIAS KLINGER DE PATRICK BAEUERLE DE EUGEN LEO DE
(43) Data de publicação do pedido: 2008.10.08	(74) Mandatário: JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2014.12.17 047/2015	

(54) Epígrafe: **MEIOS E PROCESSOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS TUMORAIS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTO MEIOS E PROCESSOS FARMACÊUTICOS PARA A PREVENÇÃO, TRATAMENTO OU MELHORIA DE LINFOMA NÃO HODGKIN DE CÉLULAS B (LNH B), INDOLENTE OU AGRESSIVO E LEUCEMIA DE CÉLULAS B, COMPREENDENDO A ADMINISTRAÇÃO DE UMA ESTRUTURA DE ANTICORPO DE CADEIA SIMPLES, BIESPECÍFICO, A UM INDIVÍDUO QUE DISSO TENHA NECESSIDADE E UTILIZAÇÃO DA REFERIDA ESTRUTURA DE ANTICORPO DE CADEIA SIMPLES, BIESPECÍFICO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA A PREVENÇÃO, TRATAMENTO OU MELHORIA DE LINFOMA NÃO HODGKIN DE CÉLULAS B (LNH B), INDOLENTE OU AGRESSIVO E LEUCEMIA DE CÉLULAS B, EM QUE A REFERIDA ESTRUTURA DEVE SER ADMINISTRADA DURANTE PELO MENOS 1 SEMANA, EM DOSES DIÁRIAS ESPECÍFICAS. ALÉM DISSO, A PRESENTE INVENÇÃO TEM POR OBJECTO ESTOJOS QUE CONTÊM UMA ESTRUTURA DE ANTICORPO DE CADEIA SIMPLES, BIESPECÍFICO PARA SER UTILIZADO DE ACORDO COM A PRESENTE INVENÇÃO.

DESCRIÇÃO

MEIOS E PROCESSOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS TUMORAIS

A presente invenção tem por objecto meios e processos farmacêuticos para intervenções médicas, imunológicas, em doentes, com base na administração de estruturas de anticorpos, em particular, estruturas biespecíficas de cadeia simples. Especificamente, a presente invenção tem por objecto meios e processos farmacêuticos para o tratamento de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo e leucemia de células B, meios e processos esses que envolvem a administração de anticorpos biespecíficos de cadeia simples. A presente invenção também tem por objecto a utilização de anticorpos biespecíficos de cadeia simples para o fabrico de medicamentos para o tratamento de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo e leucemia de células B.

As terapêuticas à base de anticorpos são amplamente utilizadas no tratamento de doenças humanas. Esses regimes de tratamento normalmente incluem múltiplas "infusões de bólus" do agente terapêutico constituído por um anticorpo, nomeadamente múltiplas injeções com uma dose elevada e normalmente intravenosas (i.v.) de anticorpos, distribuídas intermitentemente ao longo de todo o período de tratamento - de acordo com o Webster's Online Dictionary, a "infusão de bólus" indica uma única dose de um fármaco normalmente injectado num vaso sanguíneo, ao longo de um período de tempo curto; ver também www.nlm.nih.gov/medlineplus e www.phoenix5.org/glossary. Por exemplo, aplicou-se

repetidamente rituximab (rituxano), um anticorpo monoclonal anti-CD20, para o tratamento de linfoma não Hodgkin de células B (LNH) de CD20+ folicular ou reincidente ou refractário de baixo grau, com doses semanais, ao longo de 4-8 semanas (Ghiefmini M., J. Clin. Oncol. 2004). Os modelos de infusão de bólus foram também descritos para alentuzumab, um anticorpo monoclonal anti-CD52 humanizado, em leucemia linfocítica crónica (O'Brian, 2003, Cancer, 98, 2657-63), trastuzumab (herceptina, anticorpo anti-Her2) em cancro da mama com metástases, gentuzumab (mielotarg, anticorpo anti-CD33) em leucemia mielóide aguda (LMA), alentuzumab (Campath, anticorpo anti-CD52) em leucemia linfática crónica das células B (LLC) e ibritumomab (zevalina, anticorpo anti-CD20) em linfoma não Hodgkin de células B (LNH) de CD20+ folicular ou reincidente ou refractário de baixo grau (para revisão ver Cersosimo, 2003, Am. J. Health-Syst-Pharm., 60, 1531-48). O anticorpo monoclonal anti-17-1A, edrecolomab (Panorex) foi também aplicado sob a forma de infusões repetidas, começando com uma dose com uma carga elevada (500 mg) seguido, duas semanas mais tarde, de 100 mg i.v. de 28 em 28 dias (Makower, 2003, Cancer Invest., 2, 177-84). Um fenómeno comum observado na terapêutica com anticorpos é a ocorrência de efeitos secundários relacionados com a infusão, tal como o síndrome de libertação de citocina ("SLC"). O SLC é uma complicação imediata que ocorre em resposta a infusões de anticorpos que se ligam a células T. O SLC tem sido associado à activação de células T/monócitos e, secundariamente, à activação da cascata do complemento. Estes processos são mediados através da parte Fc dos anticorpos que são capazes de reticular células T e células mononucleares e activar o complemento. A patogénese do SLC tem sido atribuída à síntese do factor de necrose do tumor

(FNT) alfa, IL-2 e IL-6 e interferão gama, em resposta à estimulação de linfócitos T por OKT3. Geralmente, esses anticorpos ligam-se ao receptor da célula T, activando assim as células T. As citocinas libertadas pelas células T activadas (tais como FNT alfa, interleucinas (IL-2, IL-6) e interferões (IFN gama) produzem um tipo de resposta inflamatória sistémica semelhante à verificada em infecções graves e caracterizada por hipotensão, pirexia e calafrios. Os doentes sentem-se muito indispostos, como se tivessem febre elevada - na verdade o SLC é efectivamente um tipo de febre não infecciosa. Outros efeitos secundários descritos como estando associados ao SLC são fadiga, vômitos, taquicardia, hipertensão, dores de cabeça e dores de costas.

Também se tem observado o SLC quando se administram vários anticorpos monoclonais. Por exemplo, pode-se aproveitar a actividade anti-tumor do anticorpo anti-CD20, rituximab, para o tratamento de leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B). O escalonamento da dose, isto é, o aumento das doses, consegue-se por meio de uma dosagem três vezes por semana, necessária para que o rituximab tenha uma actividade clínica com um efeito significativo, como agente único (Lin, 2003, Seminar Oncol. 30, 483-92). Contudo, este esquema de administração provoca a libertação das citocinas FNT alfa e IL-6, cujos níveis no soro atingirão um pico 90 minutos após o início da respectiva infusão. Este aumento das citocinas é acompanhado por febre, arrepios, hipotensão e náusea (Winkler, 1999, Blood, 94, 2217-24). Pode-se reduzir a toxicidade da infusão com um agente pré-farmacêutico apropriado e um esquema de administração em etapas (Lin, 2003, Seminar Oncol. 30, 483-492).

Também se observou SLC quando se aplicaram outros formatos de anticorpos, tal como anticorpos biespecíficos. Infusões simples do anticorpo biespecífico MDX-2H12 (receptor I de anti-Fc gama x anti-Her-2/neu) em combinação com FECG (factor de estimulação de colónias de granulócitos) em doentes com cancro da mama levam a níveis máximos de FNT alfa e IL-6 às 2 e 4 horas, respectivamente, no seguimento da infusão de MDX-2H12. Os picos dos níveis de FNT alfa e IL-6 não estão correlacionados com a dose de anticorpo específico aplicada (Repp, 2003, Br. J. Cancer, 89, 2234-43).

Tal como descrito em WO 99/54440, tem-se observado SLC num estudo clínico interno realizado com o anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3) aplicado em infusões repetidas a um doente com leucemia linfática crónica derivada de células B (LLC-B). Como se mostra nas fig. 19 e 20 da WO 99/54440, tem-se verificado a libertação de FNT alfa e IL-6 e IL-8 em resposta a cada uma das duas infusões de 20 minutos administradas (3 µg e 10 µg do anticorpo biespecífico de cadeia simples, respectivamente), com a libertação de citocina após cada administração. Observou-se a libertação máxima de citocina após a administração de 10 µg de anticorpo biespecífico de cadeia simples.

A patente WO2005/040220 descreve ligantes de CD3 desimunizados, multi-específicos, sem indicação dos horários para a administração destes ligantes.

A patente WO2004/106381 descreve ligantes específicos anti-CD3 e anti-CD19, sem indicação dos horários para a administração destes ligantes.

Ten Berge et al., 1996, Transplant. Proc. 28, 3217-20 descreve um estudo que envolve a infusão contínua do anticorpo monoclonal anti-CD3, OKT3, durante 2 h. O objectivo deste estudo foi determinar se as complicações tromboembólicas conhecidas por estarem associadas à administração de OKT3 dependem da maneira como esta molécula é administrada. Geralmente, a administração de OKT3, por via de uma infusão contínua, foi melhor tolerada do que a infusão simples de bólus.

A infusão contínua também tem sido descrita na técnica anterior para agentes farmacêuticos relacionados com anticorpos. Por exemplo, o anticorpo monoclonal específico de gangliósidos GD3, R24, foi infundido continuamente, levando a toxicidades relacionadas com R24, predominantemente em doses de 25 e 50 mg/m² (Alpaugh, 1998, Med. Oncol., 15, 191-8). A infusão contínua, ao longo de 48 h, em duas infusões de 24 horas de um anticorpo monoclonal humano IgM, específica para o gangliósido GM3, em doentes com melanoma com metástases, induziu menos efeitos secundários, durante e após a infusão (Irie, 2004, Cancer Immunol. Immunother. 53, 110-7). Aqui, são necessárias taxas de administração extremamente elevadas do anticorpo terapêutico para se conseguir um efeito clínico, nomeadamente na ordem de gramas de anticorpo.

Além disso, aplicou-se um anticorpo biespecífico anti-CD16 x anti-CD30, que foi produzido como IgG1 de murino a partir de hibridomas híbridos, em diferentes esquemas de infusões, em doentes com doença de Hodgkin (Hartmann, 2001, Clin. Cancer Res., 7, 1873-1881). Este anticorpo activa células AN (*assassinas naturais, em inglês NK*) por via da ligação a CD16 (receptor III de Fc-gama). As infusões foram

dadas quer como infusões contínuas durante 24 h em 4 dias consecutivos ou como infusões de 1 h, dia sim dia não. A dose absoluta de anticorpo biespecífico, por infusão, foi de 4 vezes 25 mg numa solução de albumina humana a 5 %. Após a infusão do anticorpo biespecífico - independentemente do esquema de aplicação - não se observaram alterações consistentes nas contagens das células de sangue periférico, embora estas últimas difiram muitíssimo de indivíduo para indivíduo. Os doentes desenvolveram febre, independentemente do esquema de tratamento com o anticorpo ser contínuo ou intermitente. A infusão terapêutica do anticorpo, continuamente, em vez de se fazer intermitentemente, sob a forma de bólus, não reduz a incidência ou a gravidade dos efeitos secundários sofridos pelos doentes. Discute-se se será também necessário aumentar a eficácia anti-tumor da terapêutica do anticorpo biespecífico, por exemplo, por aplicação concomitante de citocinas, para se conseguir um aumento da quantidade e/ou do estado de activação das células efectoras visadas. Independentemente da quantidade total de 100 mg de anticorpo terapêutico utilizada no estudo descrito antes, o principal obstáculo contra uma terapêutica de sucesso e com uma ampla aplicação, com anticorpos biespecíficos, é identificado como sendo a disponibilidade limitada do anticorpo biespecífico. Os autores propõem que se poderia alcançar uma eficácia clínica consideravelmente aumentada por meio de 1) um aumento das doses de anticorpo biespecífico e 2) um aumento do número de ciclos de tratamento.

De acordo com isto, é necessária a redução de efeitos secundários indesejáveis.

Constitui por isso um objecto da presente invenção providenciar meios e processos farmacêuticos para terapêuticas clínicas à base de anticorpos, com um maior grau de tolerância por parte do doente. Especificamente, constitui um objecto que esses meios e processos permitam a retenção máxima da bioactividade do anticorpo administrado, ao mesmo tempo que se minimizam os efeitos secundários adversos e indesejáveis devidos a esta administração.

A presente invenção tem por objecto a utilização de uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento e melhoria de um cancro ou de um tumor sólido ou não sólido, em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples será permanentemente administrada por um período de tempo mais longo.

De acordo com isto, um primeiro aspecto da presente invenção providencia a utilização de uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento e melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) indolente ou agressivo ou de leucemia de células B, em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples compreende domínios de ligação específicos para CD3 humano e CD19 humano, em que as regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) correspondentes e as regiões variáveis de cadeia leve (V_L) estão arrançadas, por esta ordem, do terminal N para o terminal C

$V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),

$V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),

$V_P(CD19)-V_L(CD3)-V_P(CD19)-V_L(CD19)$ (SEQ ID NO.: 6) ou
 $V_P(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_P(CD19)$ (SEQ ID NO.: 8)

e em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples deve ser administrada durante pelo menos 1 semana, numa dose diária de 10 µg a 80 µg por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a referida dose diária deve ser administrada ao longo de pelo menos 6 h.

A presente memória descritiva também descreve um processo para prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo ou leucemia de células B, compreendendo esse processo a administração de uma composição farmacêutica que compreende uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples a um indivíduo com necessidade desse tratamento, em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples contém domínios de ligação específicos para CD3 humano e CD19 humano, em que as regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) correspondentes e as regiões variáveis de cadeia leve (V_L) correspondentes estão arrançadas, por esta ordem, do terminal N para o terminal C

$V_L(CD19)-V_P(CD19)-V_P(CD3)-V_L(CD3)$ (SEQ ID NO.: 2),
 $V_P(CD19)-V_L(CD19)-V_P(CD3)-V_L(CD3)$ (SEQ ID NO.: 4),
 $V_P(CD19)-V_L(CD3)-V_P(CD19)-V_L(CD19)$ (SEQ ID NO.: 6) ou
 $V_P(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_P(CD19)$ (SEQ ID NO.: 8),

em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples deve ser administrada durante pelo menos 1 semana, numa dose diária de 10 µg a 80 µg por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a

referida dose diária deve ser administrada ao longo de pelo menos 6 h.

Também se descreve aqui um estojo que compreende uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento e melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo ou leucemia de células B, em que a composição farmacêutica contém uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples compreendendo domínios de ligação específicos para CD3 humano e CD19 humano, em que as regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) correspondentes e as regiões variáveis de cadeia leve (V_L) correspondentes estão arrançadas, por esta ordem, do terminal N para o terminal C

$V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),
 $V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),
 $V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD3})-V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6) ou
 $V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8)

e uma folha de instruções onde se descreve o esquema de administração da estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples e que compreende a administração durante pelo menos 1 semana, numa dose diária de 10 µg a 80 µg por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a referida dose diária deve ser administrada ao longo de pelo menos 6 h.

Outra modalidade da presente invenção está relacionada com um estojo para ser utilizado na prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo ou leucemia de células B, em seres humanos, que compreende a administração de uma estrutura de

anticorpo biespecífico de cadeia simples compreendendo domínios de ligação específicos para CD3 humano e CD19 humano, em que as regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) correspondentes e as regiões variáveis de cadeia leve (V_L) correspondentes estão arrançadas, por esta ordem, do terminal N para o terminal C

$V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 2),
 $V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$ (SEQ ID NO.: 4),
 $V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD3})-V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 6) ou
 $V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})$ (SEQ ID NO.: 8),

em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples deve ser administrada durante pelo menos 1 semana, numa dose diária de 10 μg a 80 μg por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a referida dose diária deve ser administrada ao longo de pelo menos 6 h e em que o referido estojo contém os seguintes componentes:

- (a) pelo menos 7 doses diárias individuais de 140 μg a 320 μg da referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples; e
- b) meios para que os componentes estejam arrançados desta forma facilitem a tolerância a este regime.

A média da área da superfície corporal de um doente é aqui calculada no contexto do processo, estojo ou utilização, de acordo com a presente invenção, estando no intervalo de 1,7 a 2,2 m^2 .

Com vantagem, o estojo da presente invenção ainda contém, eventualmente (a) tampões de reacção, soluções de

armazenagem e/ou reagentes ou materiais remanescentes necessários para se utilizarem na reacção. Além disso, partes do estojo da presente invenção podem ser embaladas individualmente em frascos ou garrafas em combinação ou em unidades com um ou vários conteúdos. O fabrico dos estojos seguiu procedimentos perfeitamente normalizados que são conhecidos dos especialistas nesta técnica.

Para avaliar a segurança e a capacidade de tolerância do anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3), tal como se descreve aqui, o composto será administrado por meio de uma infusão contínua a longo prazo, a dois doentes com recidiva de linfoma não Hodgkin (LNH B). Ao primeiro doente tinha sido diagnosticado um linfoma folicular em 2000. Embora este doente, no passado, tenha sido submetido a várias quimio-terapias e imunoterapias, contudo a doença progrediu. Após o tratamento com uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3 aqui descrita, de acordo com as utilizações e os processos aqui indicados, a doença não só parou, mas também conseguiu-se, pela primeira vez, uma diminuição drástica das lesões do linfoma. Como se documenta nos exemplos não limitativos que se seguem, quando este doente recebeu a estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD3 x anti-CD19 aqui descrita, num nível de dose de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$, sob a forma de uma infusão contínua, durante 4 semanas, o tratamento foi bem tolerado, isto é, não se observaram efeitos secundários adversos significativos. O tratamento causou uma forte activação e expansão de células T. As células T com um fenótipo citotóxico predominantemente tem em conta a expansão das células T CD8^+ . A activação e a proliferação de células T foram induzidas no tumor por meio de células B

de linfoma comportando a estrutura de anticorpo bi-específico de cadeia simples anti-CD3 x anti-CD19, tal como aqui descrito. A determinação das contagens das células B durante o tratamento mostrou que a referida estrutura pode eliminar totalmente as células B em circulação (linfoma) devido à sua actividade citotóxica contra as células de linfoma. Numa reavaliação, após o tratamento, observou-se uma redução clara das massas tumorais de linfoma, de acordo com a avaliação da resposta para o LNH: diagnosticou-se uma diminuição da soma dos diâmetros do produto (SDP), de seis lesões de linfoma de referência, de 58 %, correspondendo a uma resposta parcial (RP) na avaliação da resposta do tumor feita por tomografia computadorizada (TC). Ao segundo doente tinha sido diagnosticado um pequeno linfoma linfocítico (PLL ou LLC-B) em 1999. Nos 7 anos de história da doença, durante os quais o doente foi submetido a 7 regimes diferentes de quimioterapia, assim como de imunoterapia e de radioterapia, sem demonstrar nenhuma resposta significativa, o tratamento deste doente com uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3, de acordo com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção, pela primeira vez, providenciou uma terapêutica com sucesso que conseguiu mais do que 50 % de diminuição das lesões de referência do linfoma. Quando o referido segundo doente tinha sido tratado continuamente com 15 µg/m²/24 h da estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3, aqui descrita, durante duas semanas, as células B (linfoma), em circulação, terão sido destruídas. Além disso, observou-se a eliminação total das células de linfoma da medula óssea, pela estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3 aqui descrita. Esta observação é consistente com uma resposta completa da medula óssea que é difícil de

conseguir, por exemplo, pela quimioterapia convencional. Numa reavaliação, após o tratamento, verificou-se uma clara redução das massas tumorais de linfoma: diagnosticou-se uma diminuição de 57,2 % da dimensão de seis lesões do linfoma de referência, por tomografia computadorizada (TC), correspondendo a uma resposta parcial (RP), na avaliação da resposta do tumor.

As expressões "anticorpo biespecífico de cadeia simples" ou "anticorpo de cadeia simples biespecífico" ou termos relacionados, de acordo com a presente invenção, significam estruturas de anticorpos que resultam da junção de pelo menos duas regiões variáveis do anticorpo numa única cadeia de polipéptido, desprovida das porções constantes e/ou de Fc presentes nas imunoglobulinas completas. Um "ligante", tal como se utiliza aqui, liga os domínios V com a mesma especificidade, enquanto um "espaçador", aqui utilizado, liga os domínios V de diferentes especificidades. Por exemplo, um anticorpo biespecífico de cadeia simples pode ser uma estrutura com um total de duas regiões variáveis de anticorpo, por exemplo, duas regiões VP, cada uma delas capaz de se ligar especificamente a um antígeno separado e ligada a outra através de um espaçador sintético curto (normalmente inferior a 10 aminoácidos) de polipéptido, de tal modo que as duas regiões variáveis de anticorpo, com os seus espaçadores interpostos, existem como uma cadeia única de polipéptidos contíguos. Outro exemplo de um anticorpo biespecífico de cadeia simples pode ser uma cadeia única de polipéptido com três regiões variáveis de anticorpo. Aqui, duas regiões variáveis de anticorpo, por exemplo, uma VP e uma VL, podem formar um scFv, em que as duas regiões variáveis de anticorpo estão ligadas uma à outra, por via

de um ligante de polipéptido sintético, sendo este último muitas vezes tratado por engenharia genética, de modo a ser minimamente imunogénico, embora permanecendo com uma resistência máxima à proteólise. Este scFv é capaz de se ligar especificamente a um antígeno particular e de se ligar a uma outra região variável do anticorpo, por exemplo, uma região VP, capaz de se ligar a um antígeno diferente do ligado a scFv. Ainda outro exemplo de um anticorpo biespecífico de cadeia simples pode ser uma cadeia única de polipéptido com quatro regiões variáveis de anticorpo. Aqui, as duas primeiras regiões variáveis de anticorpo, por exemplo, uma região VP e uma região VL, podem formar um scFv capaz de se ligar a um antígeno, em que a segunda região VP e a região VL formam um segundo scFv capaz de se ligar a outro antígeno. Dentro de uma cadeia simples de polipéptidos contíguos, as regiões variáveis de anticorpos individuais, de uma especificidade, podem ser vantajosamente separadas por um ligante sintético de polipéptido, tal como descrito antes, em que os respectivos scFv podem ser separados com vantagem por um espaçador curto de polipéptido, tal como descrito antes. Exemplos não limitativos de anticorpos biespecíficos de cadeia simples, assim como dos processos para a sua produção estão ilustrados na WO 99/54440, WO 2004/106381, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-70; Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-5; Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-7; Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-103; Brühl, J. Immunol., (2001), 166, 2420-2426.

Tal como se utiliza aqui, "CD3 humano" indica um antígeno que é expresso em células T humanas como parte do complexo de receptor multimolecular de células T, consistindo o CD3 em cinco cadeias diferentes: CD3-épsilon,

CD3-gama, CD3-delta, CD3-eta e CD3 zeta. A aglomeração de CD3 nas células T, por exemplo, por meio de anticorpos anti-CD3 leva a uma activação de células T semelhante à ligação de um antígeno, mas independente da especificidade clonal do sub-conjunto de células T, tal como descrito antes. Assim, a expressão "um anticorpo biespecífico de cadeia simples que se liga especificamente, com uma das suas especificidades, ao antígeno CD3 humano", tal como se utiliza aqui, refere-se a uma estrutura específica de CD3 capaz de se ligar ao complexo de CD3 humano expresso em células T humanas e capaz de induzir a eliminação/lise de células-alvo, em que essas células-alvo comportam/exibem um antígeno que está ligado pela outra porção de ligação não CD3 do anticorpo biespecífico de cadeia simples. A ligação do complexo de CD3 por ligantes específicos de CD3 (por exemplo, um anticorpo biespecífico de cadeia simples, conforme administrado de acordo com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção) leva à activação de células T, tal como é conhecido na técnica; ver, por exemplo, WO 99/54440 ou WO 2004/106381. De acordo com isto, uma estrutura apropriada para os meios e processos farmacêuticos da presente invenção é capaz, com vantagem, de eliminar/fazer a lise de células-alvo *in vivo* e/ou *in vitro*. As correspondentes células-alvo compreendem células que expressam um antígeno de tumor, tal como CD19, que é reconhecido pela segunda especificidade (isto é, a porção de ligação não CD3 do anticorpo biespecífico de cadeia simples) da estrutura mencionada. Preferencialmente, a referida segunda especificidade é para CD19 humano que já foi descrita na WO 99/54440 ou WO 2004/106381. De acordo com esta modalidade, cada porção específica do antígeno do anticorpo biespecífico de cadeia simples compreende uma região VP do anticorpo e uma região VL de anticorpo.

Variantes vantajosas deste anticorpo biespecífico de cadeia simples vão desde o terminal N até ao terminal C.

$V_L(CD19)-V_P(CD19)-V_P(CD3)-V_L(CD3)$ (SEQ ID NO.: 2),
 $V_P(CD19)-V_L(CD19)-V_P(CD3)-V_L(CD3)$ (SEQ ID NO.: 4),
 $V_P(CD3)-V_L(CD3)-V_P(CD19)-V_L(CD19)$ (SEQ ID NO.: 6) ou
 $V_P(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_P(CD19)$ (SEQ ID NO.: 8).

Mais particularmente, dentro do significado da presente invenção, a expressão "especificamente ligado" ou termos relacionados tais como "especificidade" deve ser entendida como sendo caracterizada principalmente por dois parâmetros: um parâmetro qualitativo (o epítopo de ligação ou onde se liga o anticorpo) e um parâmetro quantitativo (a afinidade de ligação ou *com que força* este anticorpo se liga no sítio em que se liga). Saber qual o epítopo que é ligado por um anticorpo pode ser determinado, com vantagem, por exemplo, pela metodologia SCAF, ELISA mapeamento do epítopo do lugar do péptido ou por espectroscopia de massa. A intensidade de ligação do anticorpo a um epítopo particular pode ser determinada, com vantagem, por exemplo, por metodologias conhecidas da Biacore e/ou ELISA. Uma combinação dessas técnicas permite o cálculo de uma proporção de sinal:ruído, como uma medida representativa da especificidade da ligação. Nessa proporção de sinal:ruído, o sinal representa a intensidade de ligação do anticorpo ao epítopo de interesse, em que o ruído representa a intensidade de ligação do anticorpo a outros epítopos não relacionados que diferem do epítopo de interesse. Uma proporção de sinal:ruído, por exemplo, de pelo menos 50, mas preferencialmente de cerca de 80, para o respectivo epítopo de interesse, conforme determinado, por exemplo, por Biacore, ELISA ou SCAF, pode ser tomada como uma

indicação que o anticorpo avaliado se liga ao epítopo de interesse, de uma maneira específica, isto é, é um "ligante específico". A expressão "ligação a/interacção com" também pode estar relacionada com um epítopo conformacional, um epítopo estrutural ou um epítopo descontínuo que consiste em duas regiões das moléculas-alvo humanas ou de partes delas. No contexto da presente invenção, define-se um epítopo conformacional por duas ou mais sequências discretas de aminoácidos separadas na sequência principal que aparecem em conjunto na superfície da molécula quando o polipéptido se dobra com a proteína natural (Sela, (1969) Science 166, 1365 e Laver, (1990) Cell 61, 553-6). A expressão "epítopo descontínuo" significa, no contexto da presente invenção, epítopos não lineares que se unem a partir dos resíduos de porções distantes da cadeia polipeptídica. Estes resíduos aparecem em conjunto na superfície da molécula quando a cadeia polipeptídica se dobre numa estrutura tri-dimensional para constituir um epítopo conformacional/estrutural.

De acordo com a presente invenção, a expressão "região variável", utilizada neste contexto, com a interacção do antigénio derivada de Ig, compreende fragmentos e derivados de polipéptidos que compreende pelo menos uma RDC derivada de um anticorpo, de um fragmento de anticorpo ou de um seu derivado. Considera-se na presente invenção que pelo menos uma das referidas RDC é preferencialmente uma RDC3, mais preferencialmente a RDC3 da cadeia pesada de um anticorpo (RDC-P3). Contudo, outros anticorpos derivados das RDC estão também compreendidos, particularmente, no termo "região variável".

A expressão "fragmento de anticorpo ou um seu derivado" está relacionada com anticorpos de cadeia simples ou com os seus fragmentos, anticorpos sintéticos, fragmentos de anticorpos, tais como fragmentos Fab, F(ab2)', Fv ou scFv, anticorpos de domínio simples, etc. ou um derivado modificado quimicamente de qualquer um destes. Os anticorpos que serão utilizados de acordo com a presente invenção ou as cadeias de imunoglobulina correspondentes podem ainda ser modificados fora dos elementos, utilizando técnicas convencionais conhecidas na técnica, por exemplo, utilizando eliminações, inserções, substituições, adições e/ou recombinações de aminoácidos e/ou quaisquer outras modificações (por exemplo, modificações post-tradução e químicas, tal como glicosilação e fosforilação) conhecidas na técnica, quer isoladamente quer em combinação. Os processos para a introdução dessas modificações na sequência de ADN subjacente à sequência de aminoácidos de uma cadeia de imunoglobulina são bem conhecidos dos especialistas nesta técnica; ver, por exemplo, Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2ª edição de 1989 e 3ª edição de 2001.

O termo "péptido" ou "polipéptido", tal como se utiliza aqui, descreve um grupo de moléculas que compreende o grupo de péptidos, assim como o grupo de polipéptidos. O grupo de péptidos é constituído por moléculas com até 30 aminoácidos, o grupo de polipéptidos é constituído por moléculas com mais do que 30 aminoácidos. A expressão "fragmento de anticorpo ou um seu derivado" está relacionada, particularmente, com as estruturas de péptidos ou de polipéptidos que compreendem pelo menos uma RDC, preferencialmente uma RDC-P3. Os fragmentos ou derivados

das referidas moléculas de anticorpos definem péptidos ou polipéptidos que são partes das moléculas de anticorpo anteriores e/ou que são modificados por processos químicos/bioquímicos ou processos de biologia molecular. Os processos correspondentes são conhecidos na técnica e estão descritos, *inter alia*, em manuais de laboratório (ver Sambrook et al., loc cit.; Gerhardt et al.; Methods for General and Molecular Bacteriology; ASM Press, 1994; Lefkovits; Immunology Methods Manual: in laboratory manuals (ver Sambrook et al., loc cit.; Gerhardt et al.; Methods for General and Molecular Bacteriology; ASM Press, 1994; Lefkovits; Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques; Academic Press, 1997; Golemis; Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002)). Os processos para a identificação de elementos na sequência de amino-ácidos de um dado polipéptido são conhecidos dos especialistas na técnica e estão descritos em vários manuais de laboratório (por exemplo, no Sambrook et al., loc cit.; Mülhardt; Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics; Spektrum Akademischer Verlag, 2001). Além disso, os referidos processos estão exemplificados nos exemplos em anexo.

O termo "administrado", tal como se utiliza aqui, significa a administração, a um indivíduo, de uma dose eficaz sob o ponto de vista terapêutico do anticorpo biespecífico de cadeia simples mencionado antes. Por "quantidade eficaz, sob o ponto de vista terapêutico" entende-se uma dose que produz os efeitos para os quais foi administrada. A dose exacta dependerá da finalidade do tratamento e será acertada por um especialista na técnica, utilizando técnicas conhecidas. Como é conhecido na técnica

e já foi descrito antes, podem ser necessários ajustamentos para a administração sistémica *versus* a localizada, em função da idade, peso corporal, estado geral de saúde, género, dieta, tempo de administração, interacção de fármacos e gravidade do estado clínico e serão acertados por meio de experiências de rotina por parte dos especialistas na técnica. O médico assistente e os factores clínicos irão determinar o regime de dosagem. Como é bem conhecido nas práticas clínicas, as doses para qualquer doente dependem de muitos factores, incluindo o tamanho do doente, a área da superfície corporal, a idade, o composto particular a ser administrado, o género, o tempo e a via de administração, o estado geral de saúde e outros fármacos que estejam a ser administrados conjuntamente. Como é bem conhecido nas práticas clínicas, as doses para qualquer doente dependem de muitos factores, incluindo o tamanho do doente, a área da superfície corporal, a idade, o composto particular a ser administrado, o género, o tempo e a via de administração, o estado geral de saúde e outros fármacos que estejam a ser administrados conjuntamente. Uma dose típica pode estar, por exemplo, no intervalo estabelecido nas modalidades da presente invenção e nos exemplos em anexo; contudo, também se podem considerar doses acima ou abaixo deste intervalo dos exemplos, considerando em especial os factores mencionados antes.

Tal como aqui descrito, estudos prévios utilizaram, preferencialmente, infusões de bólus, para a administração de anticorpos terapêuticos. A expressão "infusão de bólus", tal como se utiliza aqui, refere-se a uma infusão que é interrompida em menos de 6 horas, enquanto a expressão "infusão contínua" refere-se a uma infusão que se deixa prosseguir permanentemente durante pelo menos 6 horas, sem

interrupção. "Infusão contínua" refere-se a uma infusão administrada em permanência. De acordo com isto, no contexto da presente invenção, os termos "permanente" e "contínua", são utilizados como sinónimos. Dentro do significado da presente invenção, a expressão "administração ao longo de pelo menos 6 h" indica uma situação em que o anticorpo biespecífico de cadeia única utilizado nos meios e processos farmacêuticos, de acordo com a presente invenção, é administrado continuamente ao corpo de um doente, de uma forma constante e sustentada, ao longo de toda a duração, nos meios e processos farmacêuticos da presente invenção. Deve-se evitar uma interrupção da introdução do anticorpo biespecífico de cadeia única, quer dizer, não deve ocorrer nenhuma interrupção de uma transição desde um estado em que este anticorpo está a ser administrado ao corpo do doente, até ao estado em que este anticorpo já não está a ser administrado ao corpo do doente, ao longo da toda a duração da administração requerida pelos meios e processos farmacêuticos da presente invenção, por nenhuma razão, para além da carga com o anticorpo biespecífico de cadeia única a ser administrado ou intervenções médicas que se tornem necessárias e similares. Desde que o reabastecimento seja necessário, faz-se uma interrupção temporária da introdução do anticorpo administrado, de tal modo que essa administração seja entendida como "não sendo interrompida" ou seja "permanente", no sentido dos meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção. Na maior parte dos casos, esse reabastecimento deve ser, geralmente, de uma duração tão curta que, o tempo em que o anticorpo não está a ser introduzido no corpo do doente, deve ser praticamente inexistente, em comparação com o tempo planeado para o regime total de administração, de acordo

com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção. Especialmente preferidos são os cenários em que a administração do anticorpo biespecífico de cadeia única ocorre ininterruptamente ou permanentemente, durante pelo menos 1 semana; ou 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 semanas ou ainda mais tempo. Numa modalidade mais preferida, o anticorpo biespecífico de cadeia única é administrado continuamente, ao longo de 24 h, durante 4 a 8 semanas, isto é, durante 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas. Por exemplo, isso pode fazer-se após o estadiamento dos doentes tratados após uma administração contínua durante 4 semanas, pode-se diagnosticar uma resposta mínima ou parcial (tal como se define a seguir) ao tratamento com o anticorpo biespecífico de cadeia única. Neste caso, a administração contínua pode ser prolongada de modo a conseguir-se um resultado terapêutico ainda melhor, por exemplo, uma resposta completa. A continuação da administração não interrompida do anticorpo biespecífico de cadeia única, à maneira dos meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção, por períodos de tempo mais longos, permite a activação vantajosa das células T mencionada a seguir, para exercer os seus efeitos durante um período suficientemente longo para depurar, com vantagem, todas as células doentes do corpo. Desde que se mantenha baixa a velocidade de administração não interrompida do anticorpo biespecífico de cadeia única, pode-se continuar a aplicação do agente terapêutico durante mais tempo, sem o risco de efeitos secundários prejudiciais para o doente.

Verificou-se que se podem obter efeitos benéficos e inesperados dos meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção por meio da administração do anticorpo biespecífico de cadeia única, numa diária de

10 µg a 80 µg por metro quadrado da área da superfície corporal. A dose diária pode manter-se constante ao longo do período de administração. Contudo, está também dentro do âmbito desta modalidade que, para os dias iniciais do período de infusão, seja administrada uma dose mais baixa do anticorpo biespecífico de cadeia única ("dose inicial") antes dos processos farmacêuticos aqui descritos, enquanto no período remanescente da infusão deve aplicar-se uma dose mais elevada ("dose de manutenção"). Por exemplo, pode-se administrar, no primeiro dia do período de infusão, 5 µg de anticorpo biespecífico de cadeia única, seguido da administração de 15 µg por metro quadrado de superfície corporal, como dose diária, durante o período remanescente. Ou pode-se administrar, no primeiro dia do período de infusão, 15 µg de anticorpo biespecífico de cadeia única, por metro quadrado de superfície corporal, seguido da administração de 45 µg por metro quadrado de superfície corporal, como dose diária, durante o período remanescente. Também se considera que se pode administrar 5 µg do anticorpo biespecífico de cadeia única por metro quadrado de superfície corporal, no primeiro dia do período de infusão, seguido da administração de 15 µg do anticorpo biespecífico de cadeia única por metro quadrado de superfície corporal, no segundo dia do período de infusão, seguido da administração de 45 µg por metro quadrado de superfície corporal, como dose diária (manutenção) para o período remanescente. Assim, no primeiro dia ou no primeiro e no segundo dias de tratamento, a estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única pode ser administrada numa dose inicial (diária) inferior a 10 µg a 80 µg por metro quadrado de superfície corporal, de modo a adaptar lentamente o organismo do doente ao tratamento. Depois pode-se administrar uma dose de manutenção real de 10 µg a

80 µg por metro quadrado de superfície corporal do doente. A média da área da superfície corporal de um doente é aqui calculada no contexto do processo, estorjo ou utilização, de acordo com a presente invenção, estando no intervalo de 1,7 a 2,2 m². Os requerentes verificaram que mantendo ininterrupta a taxa de anticorpo biespecífico de cadeia única administrado (isto é, infundido continuamente) em relação ao mínimo absoluto requerido para alcançar o efeito terapêutico desejado, ao longo do tempo, pode-se conseguir o aumento da activação das células T descrito antes, como sendo benéfico. Para além das vantagens enumeradas a seguir e que estão associadas com a simulação da activação natural de células T, a aplicação de taxas mais baixas de anticorpo biespecífico de cadeia única requer quantidades absolutas menores do anticorpo biespecífico de cadeia única administrado. Isto resulta em custos menores para o doente, individualmente, tornando possível o tratamento de acordo com os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção para um segmento mais alargado de doentes que dele necessitem.

Dentro do significado da presente invenção, a expressão "linfoma não Hodgkin de células B" ou "linfoma não Hodgkin derivado de células B" compreende tanto o linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) indolente como o agressivo. A expressão "linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) indolente ou agressivo", tal como se utiliza aqui, representa doenças tumorais malignas derivadas de células B. Os LNH B indolentes são os linfomas menos malignos. Os LNH B agressivos são linfomas altamente malignos. O linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) pode ser, com vantagem, um linfoma folicular, um linfoma linfoplasmocítico, um linfoma de células da zona marginal, um linfoma de células do manto

(LCM), um linfoma de células B grandes e difusas (LCBGD), um linfoma de Burkitt, um linfoma linfocítico pequeno (LLP/LLC) e qualquer outro sub-tipo derivado de células B. A expressão "leucemia de células B", tal como se utiliza aqui, pode ser, com vantagem, qualquer leucemia de células B (por exemplo, leucemia linfocítica crónica ou leucemia linfocítica aguda). Para outra referência ver <http://www.cancer.org>. Preferencialmente, o linfoma não Hodgkin de células B indolente pode ser tratado com um anticorpo biespecífico de cadeia única dirigido contra tanto CD3 humano como CD19 humano, como se demonstra nos exemplos que se seguem.

O termo "prevenção", tal como se utiliza aqui, deve ser entendido como se segue: depois da remissão completa das lesões do linfoma num doente humano, após tratamento quimioterapêutico ou radiológico das lesões do linfoma, pode dar-se o caso de nem todas as células de linfoma serem eliminadas do corpo. Contudo, estas células de tumor remanescentes podem dar origem a linfomas recorrentes. Os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção podem ser utilizados para matar estas células de tumor remanescentes, de modo a prevenir a recorrência do linfoma (com origem nas células de linfoma ocultas que permanecem no corpo após a terapêutica primária). Desta forma, os meios e processos farmacêuticos ajudam a prevenir a recaída da doença em doentes com LNH B ou leucemia de células B.

Em estudos de clínica interna, tem sido avaliado o perfil de segurança de um anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Como resultado, têm-se observado efeitos indesejáveis da primeira dose após

infusões em bólus repetidas de doses iguais do anticorpo biespecífico de cadeia única a doentes com uma situação maligna refractária de células B. Tal como se mostra aqui a seguir, a intensidade de SLC foi a mais alta após a administração da primeira dose, com uma resposta decrescente a infusões subsequentes de anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Após 6 infusões, não se observou quase nenhuma indução dos níveis de citocina, em comparação com os níveis iniciais. Também quando se administram doses escalonadas de anticorpo biespecífico de cadeia única, a doentes com leucemia linfocítica crónica refractária de células B, pode observar-se uma redução da intensidade de SLC, após a administração repetida de anticorpo biespecífico de cadeia única. Sem estar ligado a qualquer teoria, o fenómeno referido é muito provavelmente atribuído a uma adaptação das células T a um estímulo repetido ("silenciamento de células T"). Além disso, quando se monitoriza o número de células T em doentes tratados, encontraram-se flutuações robustas dos números das células T após infusão, sugerindo uma activação de células T de curto prazo do tipo proliferação. A actividade biológica do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 poderá ser demonstrada nestes estudos, resultando na activação de células T, libertação de citocinas e diminuição das contagens de células B, mas não se definiu nenhuma dose biológica óptima (DBO). Além disso, têm sido observados efeitos secundários adversos com SLC.

Ao contrário e como se verificou, surpreendentemente, no contexto da presente invenção, os efeitos biológicos desejados, isto é, a activação e a expansão das células T a longo prazo e a actividade citotóxica contra células

tumorais pelo anticorpo biespecífico de cadeia única aqui descrito, podem ser conseguidos (enquanto se reduz, minimiza ou abole completamente os efeitos secundários indesejáveis normalmente associados com a aplicação em bólus de um anticorpo terapêutico) por exemplo, por administração do anticorpo biespecífico de cadeia única durante pelo menos 1 semana numa dose diária de 10 µg a 80 µg por metro quadrado de superfície corporal do doente, enquanto a referida dose diária é administrado ao longo de 6 h. Tal como está documentado nos exemplos não limitativos em anexo, administram-se continuamente quantidades pequenas de anticorpo biespecífico de cadeia única, isto é, 15 µg/m² de anticorpo biespecífico de cadeia única, ao longo de 24 h, durante pelo menos duas semanas, a doentes com linfoma linfocítico pequeno (LLP/LLC) ou linfoma circular, são suficientes para a activação e a proliferação, *in vivo* de células T, a longo prazo, resultando numa resposta substancial anti-tumor: dois doentes tiveram uma resposta parcial (RP), isto é, uma diminuição de seis linfomas de referência, de mais do que 50 %. Além disso, num destes doentes, foi demonstrada uma depleção eficaz de células de linfoma da medula óssea, que é difícil de conseguir por abordagens convencionais tais como quimioterapia. É importante que essas doses baixas de anticorpo biespecífico de cadeia única levem a uma resposta das células T mais fisiológica em doentes, em comparação com a administração em bólus do anticorpo biespecífico de cadeia única. Além disso, os processos e utilizações indicados aqui não causam efeitos secundários adversos significativos normalmente associados com a activação de células T, tal como SLC. Estas doses baixas são ainda capazes de induzir uma resposta anti-tumor benéfica em doentes com linfoma não

Hodgkin de células B (LNH B) indolente ou agressivo ou leucemia de células B.

Com os esquemas anteriores de administração, utilizando infusões em bólus repetidas, mesmo com a dose inicial mais baixa administrada internamente em ensaio clínicos da fase I, observou-se um súbito declínio nas contagens de leucócitos do sangue periférico, incluindo células T CD3+, CD4+ e CD8+ (ver exemplos). Uma explicação para esta queda é a súbita adesão e - pelo menos parcial - migração, para os tecidos, de células T activadas e outros leucócitos activados. Crê-se que a disfunção e os distúrbios endoteliais resultantes dos perfis locais das citocinas, por meio desta activação súbita das células T do anticorpo biespecífico de cadeia única administrado em bólus, contribui significativamente para os efeitos secundários adversos normalmente observados em SLC. Ao contrário, tal como demonstrado nos exemplos que se seguem, os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção permitem uma activação mais gradual (e inconstante) das populações de células T, sugerindo que a quantidade de citocinas libertada foi drasticamente reduzida. Providenciar meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção evita assim fenómenos tais como um distúrbio súbito das redes locais de citocinas. Consequentemente, não foram relatados nenhuns efeitos secundários adversos significativos de doentes tratados de acordo com os processos e as utilizações da presente invenção. Além disso, a administração de um anticorpo biespecífico de cadeia única, de acordo com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção, não causa quaisquer flutuações drásticas de células T, conforme

observado, após infusões de bólus do anticorpo biespecífico de cadeia única.

Tal como se mostra nos exemplos, embora uma diminuição ligeira do número de células T possa ser observada no início do período de infusão (que muito provavelmente é devida ao esteróide co-administrado), o tratamento de acordo com a presente invenção leva a um aumento do número de células T activadas no sangue. Especificamente, os números de células T CD8+ citotóxicas aumentam devido à proliferação. Isto tem particular relevância para doenças tumorais que mostram proporções de células efectoras:alvo (E:T) desfavoráveis, tal como lesões de linfoma de células B, atingindo proporções de E:A de 1:100 - 1:1000 *in vivo*. Essas proporções desfavoráveis de E:A podem resultar na morte mais lenta das células B, tal como sugerido por experiências anteriores *in vitro*. Nessas condições, tem de se presumir que as mesmas células T têm potencial para matar repetidamente células B o que leva a uma redução significativa da massa tumoral. Além disso, pode-se pôr como hipótese que uma expansão do aglomerado de células T localizado em células B malignas (por exemplo, num linfoma de células B), para aumentar a proporção de E:A, pode ser necessário para se conseguir um resultado terapêutico. Dado que os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção providenciam, pelo menos para números constantes ou mesmo crescentes de células T activadas na corrente sanguínea, citotoxicidade potencial contra células tumorais, por exemplo, as células B tumorais, em linfomas de células B, melhora com o tempo.

Além disso, os meios e processos farmacêuticos, de acordo com a presente invenção, levam a uma activação a

longo prazo das células T CD8+, como exemplificado pelo marcador de activação HLA-DR (marcador de activação a longo prazo) em comparação com CD69 ou CD25 (marcador de activação de curto prazo). Como foi referido antes, uma pequena quantidade de anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, administrada continuamente, é suficiente para aumentar o número de células T CD8+ activadas, ao longo de um período de tempo, tal como demonstrado, por exemplo, nos exemplos em anexo e nas figuras 6 a 8. Isto está em claro contraste com a activação de células T como uma erupção, após administração em bólus de anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3; ver, por exemplo, a fig. 1. A presença prolongada do anticorpo biespecífico de cadeia única, de acordo com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção, permitindo uma activação gradual e a proliferação de células T a longo prazo é assim particularmente apropriada para o tratamento de doenças tumorais caracterizadas por proporções de E:T desfavoráveis, tal como linfomas de células B. Além disso, tem sido observado que, após o reinício da infusão contínua (por exemplo, depois da intervenção médica), ocorre uma activação e uma expansão muito mais rápidas e fortes das células T CD8+ citotóxicas. Assim, prefere-se realizar vários ciclos de infusão, seguidos de períodos isentos de infusão. Por exemplo, está dentro do âmbito da presente invenção que um doente possa receber uma infusão contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única aqui definido, durante quatro semanas, seguido de um período isentos de infusão, durante quatro semanas. Depois, esta sequência pode-se repetir uma, duas, três ou mais vezes ou ainda mais vezes.

Além disso, embora a activação de células T a longo prazo possa ser observada em doentes tratados de acordo com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção, os efeitos secundários adversos associados estão significativamente reduzidos ou mesmo eliminados. Os efeitos secundários relacionados com SLC podem assim ser minimizados ou prevenidos por aplicação do anticorpo biespecífico de cadeia única, de acordo com os meios e processos farmacêuticos da presente invenção.

Finalmente, deve ser enfatizado que, embora se tenham aplicado apenas pequenas quantidades de anticorpo biespecífico de cadeia única nos usos, processos e estojos aqui descritos, o tratamento com o anticorpo é muito eficaz na depleção de células B tumorais, causando assim uma resposta anti-tumoral detectável *in vivo*. Isto é exemplificado pelas contagens das células B nas figuras 9 e 11 e pelas reduções da dimensão do linfoma, ilustradas nas figuras 10 e 13. Em particular, dois doentes tratados de acordo com os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção e uma resposta parcial, isto é, a diminuição de seis lesões de referência do linfoma, da ordem de mais de 50 %. Além disso, num dos doentes, demonstrou-se uma depleção eficaz das células de linfoma da medula óssea; ver figura 12. Assim, quando se aplicam os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção, os efeitos adversos são reduzidos ou eliminados sem qualquer decréscimo concomitante da actividade citotóxica. Pelo contrário, o modo de administração em bólus, da terapêutica com anticorpo, resulta numa activação massiva das células T e, a curto prazo, a subsequente realocização/deslocação das células T activadas para o endotélio e o tecido ficando apenas um pequeno número de

células T eficazes na corrente sanguínea. Como é bem conhecido na técnica, o endotélio pode ser gravemente desagregado pela activação massiva das células T e subsequente adesão de células T às células endoteliais e migração para os tecidos. Em condições patológicas, pode-se observar essa súbita activação de células T, por exemplo, na septicémia massiva causada por toxinas bacterianas (ver, por exemplo, Li (2004), Br. J. Pharmacol. 141(4): 709-16; Matzen (2004), Virus Res. 104(2): 145-55; Jacob HS. (1980) Arch. Pathol. Lab. Med. 104(12): 617-20; Salyer (1990), Am. J. Pathol. 136(4): 831-41; Okajima (2004) Curr. Vasc. Pharmacol. 2(2): 125-33; Ferrero (2004) Methods Mol. Med. 98: 127-36). Além disso, esta activação de células T, semelhante a uma erupção, está associada a efeitos secundários adversos causados por citocinas. Com os estudos de dosagem anteriores, utilizando infusões em bólus repetidas, mesmo com a dose inicial mais baixa administrada internamente em ensaio clínicos da fase I, observou-se um súbito declínio nas contagens de leucócitos do sangue periférico, incluindo células T CD3+, CD4+ e CD8+. Uma explicação para esta queda é a súbita adesão e - pelo menos parcial - migração, para os tecidos, de células T activadas e outros leucócitos activados. Põe-se a hipótese de essa abrupta activação e deslocação de populações enormes de células T activadas (aproximadamente 70 % do conjunto de células T humanas residentes no sangue periférico, em qualquer momento) resultar num distúrbio da homeostase das células T e dos perfis locais de citocina nos tecidos. Assim, uma exposição relativamente prolongada a este anti-corpo biespecífico de cadeia única e uma diminuição significativa da dose dada por unidade de tempo, quando comparada com os estudos anteriores da fase I, aumenta

potencialmente a capacidade de tolerância e maximiza a actividade anti-tumor do fármaco.

Em estudos clínicos anteriores que investigaram a segurança e a tolerância de infusões em bólus repetidas do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, observaram-se flutuações indesejáveis do número das células T após cada infusão, sugerindo uma activação de células T semelhante a uma erupção, dependente de cada infusão. Nomeadamente, verificou-se este efeito para a administração tanto de doses iguais como de doses escalonadas do anticorpo biespecífico de cadeia única indicado.

A disposição de meios e processos farmacêuticos, de acordo com a presente invenção, manifesta um modelo qualitativamente distinto da activação de células T, quando comparado com o obtido no seguimento de infusão em bólus de maiores quantidades de anticorpo. Especificamente, verificou-se que a administração de anticorpo biespecífico de cadeia única, de acordo com os meios e processos farmacêuticos de acordo com a presente invenção, leva a um aumento inicial lento seguido da manutenção de uma resposta imunitária celular *in vivo* constante ou mesmo crescente, simulando o observado no decurso de infecções naturais, por exemplo, infecções virais. Numa infecção natural, a circulação de células T, específica para um antigénio patogénico, torna-se activa quando encontram este antigénio nos tecidos linfóides de drenagem. No seguimento dessa activação, numa infecção natural, ocorre uma proliferação de sub-conjunto de células T que são específicas para o antigénio patogénico. Este aumento está correlacionado, devido à proliferação de células T CD8⁺, com um aumento do

potencial citotóxico contra o agente patogénico invasor ou contra as células infectadas por este agente patogénico. Os meios e processos farmacêuticos da presente invenção simulam assim a resposta imunitária a uma infecção natural, por exemplo, uma infecção viral, pelo facto de ocorrer um aumento lento e gradual do número de células T activadas.

Em resumo, a presente invenção providencia vantagens significativas:

- simulação de uma resposta das células T mais fisiológica, não existência de flutuações drásticas das células T, número constante ou mesmo crescente de células T efectoras (citotóxicas) na corrente sanguínea.
- libertação reduzida de citocinas/sem os primeiros efeitos da dose devido a quantidades baixas do anti-corpo biespecífico de cadeia única, com uma actividade anti-tumor (CTL) eficaz (dois doentes com resposta parcial, um dos quais com uma depleção eficiente de células de linfoma da medula óssea).
- efeitos secundários adversos reduzidos
- minimização da activação de células T aberrantes por activação repetida de células T e ciclos de desactivação.
- activação a longo prazo e expansão de células T citotóxicas
- a presença prolongada do fármaco ajuda a ultrapassar proporções de E:T desfavoráveis frequentemente presentes em lesões de linfoma que levam a uma morte de células B muito mais lenta do que antecipado originalmente.

- a presença prolongada do fármaco permite que tenha lugar a morte repetitiva de células B, desempenhada por uma e a mesma células T e assim assegura a redução de massas de tumor significativas
- uma expansão de um conjunto de células T localizadas aumenta a proporção de E:T e os resultados terapêuticos
- há uma variação notável da actividade *in vitro* (reflectida na variação dos valores de CE_{50}) entre diferentes dadores de células mononucleares de sangue periférico (CMSP). A exposição prolongada no tempo ao fármaco aumenta a actividade citotóxica anti-CD19 dirigida, numa proporção significativa de doentes.

Assim, uma exposição significativamente prolongada ao fármaco e um decréscimo significativo da dose dada por unidade de tempo, quando comparados com os estudos anteriores da fase I, aumenta potencialmente a tolerância e maximiza a actividade anti-tumor do fármaco, o que resulta num melhor perfil de segurança.

A administração, de acordo com o regime da presente invenção, pode ser feita ao longo de 6 h, 7 h, 8 h, 9 h, 10 h, 11 h, 12 h, 13 h, 14 h por dia ou ainda ao longo de 24 h. Preferencialmente, a administração, de acordo com o regime da presente invenção, é superior a 10 h, mais preferencialmente superior a 12 h ou ainda mais preferencialmente superior a 24 h.

Numa modalidade preferida da estrutura do anticorpo biespecífico de cadeia única para ser utilizada num processo, na utilização ou num estojo da presente invenção, a dose diária da referida estrutura de anticorpo

biespecífico de cadeia única é administrada ao longo de pelo menos 8 h, mais preferencialmente pelo menos 10 h.

Numa modalidade ainda mais preferida da estrutura do anticorpo biespecífico de cadeia única para ser utilizada num processo, na utilização ou num estojo da presente invenção, a dose diária é administrada ao longo de pelo menos 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h ou 22 h. Mais preferencialmente, administra-se a dose diária durante todo o dia, isto é, ao longo de 24 h.

Noutra modalidade preferida da estrutura do anticorpo biespecífico de cadeia única para ser utilizada num processo, na utilização ou num estojo da presente invenção, as referidas regiões V_p e V_L do referido domínio específico de CD3 derivam de um anticorpo específico de CD3 seleccionado no grupo que consiste em: OKT-3, X35-3, VIT3, BMA030 (BW264/56), CLB-T3/3, CRIS7, YTH12.5, F111-409, CLB-T3.4.2, TR-66, WT31, WT32, SPv-T3b, 11D8, XIII-141, XIII-46, XIII-87, 12F6, T3/RW2-8C8, T3/RW2-4B6, OKT3D, M-T301, SMC2 e F101.01. Cada um destes anticorpos está bem descrito na técnica.

Mais particularmente, a referida região V_p do referido domínio específico de CD3 compreende pelo menos uma região RDC3 que compreende ou que representa uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO. 11, compreendendo a referida região V_p do referido domínio específico de CD3, pelo menos uma região RDC2 que compreende ou que representa uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO. 10 e/ou a referida região V_p do referido domínio específico de CD3 compreende, preferencialmente, pelo menos uma região

RDC1 que compreende ou que representa uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO. 9.

A estrutura da presente invenção pode também conter regiões V_L . Essa região V_L do referido domínio específico de CD3 compreende pelo menos uma região RDC3 que compreende ou que representa uma sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO. 14, a referida região V_L do referido domínio específico de CD3 compreende pelo menos uma região RDC2 que compreende ou que representa uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 13 e/ou a referida região V_L do referido domínio específico de CD3 compreende pelo menos uma região RDC1 que compreende ou que representa uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO. 12.

Entende-se que, na modalidade mais preferida, as RDC definidas antes (RDC1, RDC2, RDC3) estão contidas numa estrutura biespecífica única, para serem administradas de acordo com a presente invenção.

Noutra modalidade preferida da estrutura biespecífica do anticorpo de cadeia única para ser utilizada num processo, numa utilização ou num estojo de acordo com a presente invenção, a região V_P do referido domínio específico de CD3 compreende ou representa a SEQ ID NO 17, a região V_P do referido domínio específico de CD19 compreende ou representa a SEQ ID NO 15, a região V_L do referido domínio específico de CD3 compreende ou representa a SEQ ID NO 18 e/ou a região V_L do referido domínio específico de CD19 compreende ou representa a SEQ ID NO 16.

Também se considera que a estrutura biespecífica do anticorpo de cadeia única para ser utilizada num processo,

numa utilização ou num estojo de acordo com a presente invenção faz uso de uma estrutura biespecífica do anticorpo de cadeia única que compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada no grupo que consiste em

- (a) uma sequência de aminoácidos conforme descrito nas SEQ ID N°s 2, 4, 6 ou 8;
- (b) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos, conforme se mostra nas SEQ ID N°s 1, 3, 5 ou 7;
- (c) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos tendo pelo menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % de identidade com uma sequência de ácidos nucleicos de (b), em que a referida sequência de aminoácidos é capaz de se ligar (especificamente) a CD3 e a CD19; e
- (d) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que está degenerada em resultado do código genético, numa sequência de nucleótidos de (b), em que a referida sequência de aminoácidos é capaz de se ligar (especificamente) a CD3 e a CD19,

Quando qualquer molécula particular de ácido nucleico ou de polipéptido é pelo menos 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma sequência de nucleótidos ou de aminoácidos aqui definida, pode ser determinada convencionalmente utilizando programas de computador conhecidos. Um processo preferido para a determinação do melhor emparelhamento global entre uma sequência de pesquisa (uma sequência aqui definida) e uma sequência-alvo, também referida como uma sequência de alinhamento, pode ser determinado utilizando o programa de

computador FASTDB, com base no algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6: 237-245 (1990)). Num alinhamento de sequências a pesquisa da sequência e as sequências alvo são ambas sequências de ADN. Uma sequência de ARN pode ser comparada convertendo U em T.

Numa modalidade preferida da estrutura biespecífica do anticorpo de cadeia única para ser utilizada num processo, numa utilização ou num estojo de acordo com a presente invenção, os referidos domínios variáveis estão ligados por ligantes adicionais e/ou sequências espaçadoras, tal como definido antes e se mostra, por exemplo, na WO 2004/106381.

Numa modalidade preferida da estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única para ser utilizada num processo, na utilização ou num estojo da presente invenção, a administração diária é contínua durante pelo menos 2 semanas, pelo menos 3 semanas, pelo menos 4 semanas ou pelo menos 8 semanas. De acordo com isto, considera-se que a administração se faz numa base permanente durante pelo menos 6 h por dia, preferencialmente durante pelo menos 8 h por dia, mais preferencialmente pelo menos 10 h por dia, sendo mais preferencial 24 h por dia, durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 semanas ou ainda mais tempo. Assim, prefere-se realizar vários ciclos de infusão, seguidos de períodos isentos de infusão. Por exemplo, está dentro do âmbito da presente invenção que um doente possa receber uma infusão contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única aqui definida, durante quatro semanas, seguido de um período isento de infusão, durante quatro semanas. Depois esta sequência pode-se repetir uma, duas, três ou mesmo mais vezes, até as lesões de linfoma estarem num nível detectável por meios convencionais, por exemplo, tomografia

computorizada. Com vantagem, prolonga-se a administração até se conseguir uma resposta completa, isto é até se matarem todas ou praticamente todas as células de linfoma. Além disso, tem sido observado que, após o reinício da infusão contínua (por exemplo, depois de um período sem infusão ou após uma intervenção médica), ocorre uma activação e uma expansão muito mais fortes e rápidas das células T CD8+ citotóxicas. Assim, prefere-se realizar vários ciclos de infusão, seguidos de períodos isentos de infusão.

Noutra modalidade preferida da estrutura biespecífica de anticorpo de cadeia única para ser utilizada num processo, na utilização ou num estojo da presente invenção, a composição é administrada em combinação com um ou mais agentes farmacêuticos.

A presente invenção é também útil em abordagens de co-terapêuticas e em (a) regimes de co-terapêutica. Nalgumas modalidades, os anticorpos biespecíficos de cadeia única, tal como aqui definido, serão administrados em combinação com uma ou mais outras terapêuticas. Nalgumas modalidades, os anticorpos biespecíficos de cadeia única, tal como aqui definidos, serão administrados a um doente concomitantemente com uma ou mais outras terapêuticas. Preferencialmente, essas terapêuticas são úteis para o tratamento de uma LNH B ou uma leucemia de células B, tal como aqui definido. O termo "concomitantemente" não se limita à administração de agentes farmacêuticos ou terapêuticos, exactamente ao mesmo tempo, mas também pode significar que os anticorpos biespecíficos de cadeia única, tal como aqui definidos e o outro agente, são administrados a um indivíduo numa sequência e dentro de um intervalo de

tempo tal que os anticorpos biespecíficos de cadeia única, tal como aqui definidos, podem actuar em conjunto com o outro agente, para providenciar um maior benefício do que aquele que seria conseguido se fosse administrado de outra forma. Por exemplo, cada agente farmacêutico ou terapêutico pode ser administrado ao mesmo tempo ou sequencialmente, por qualquer ordem, em diferentes momentos; contudo, se não for administrado ao mesmo tempo, deve ser administrado suficientemente próximo, no tempo, de modo a providenciar o efeito terapêutico ou farmacêutico desejado. Cada agente (co)-terapêutico pode ser administrado separadamente, sob qualquer forma apropriada e por qualquer via apropriada. Noutras modalidades, os anticorpos biespecíficos de cadeia única, tal como aqui definidos, serão administrados antes, ao mesmo tempo ou após uma cirurgia. Preferencialmente, a cirurgia elimina completamente os linfomas localizados ou reduz a dimensão de tumores grandes. A cirurgia pode também ser feita como uma medida preventiva ou para aliviar a dor. As quantidades da dose e as frequências de administração providenciadas aqui estão englobadas pelos termos de eficácia sob o ponto de vista terapêutico. A dose e a frequência variarão, normalmente, de acordo com factores específicos para cada doente, consoante os agente terapêuticos ou farmacêuticos administrados, a gravidade e o tipo de LNH B ou leucemia das células B, a via de administração, assim como a idade, o peso corporal, a resposta e a história clínica passada do doente. Os regimes apropriados podem ser seleccionados por um especialista na técnica, considerando esses factores e, em seguida, por exemplo, as doses referidas na literatura e recomendadas no Physician's Desk Reference (59ª ed., sup. 2005).

Nalgumas modalidades, a terapêutica feita por administração dos anticorpos biespecíficos de cadeia única, tal como aqui definida, pode ser combinada com a administração de uma ou mais terapêuticas tais como quimioterapias, radio-terapias, terapias hormonais e/ou terapias biológicas/imunoterapias. Os agentes farmacêuticos ou terapêuticos incluem, mas não se limitam a moléculas proteínáceas, incluindo, mas não se limitando a péptidos, polipéptidos, proteínas, incluindo proteínas modificadas post-translacionalmente, anticorpos, etc.; ou moléculas pequenas (inferiores a 1000 daltons), compostos inorgânicos ou orgânicos; ou moléculas de ácidos nucleicos incluindo, mas não se limitando a ADN de hélice dupla ou de hélice única ou a ARN de hélice dupla ou de hélice única, assim como moléculas de ácidos nucleicos de hélice tripla. Os agentes farmacêuticos ou terapêuticos podem derivar de qualquer organismo conhecido (incluindo, mas não se limitando a animais, plantas, bactérias, fungos e protistas ou vírus) ou de uma biblioteca de moléculas sintéticas.

A referida co-terapia compreende a co-administração de um ou mais agentes terapêuticos ou farmacêuticos antes durante e/ou no seguimento da administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única. Os referidos agentes farmacêuticos ou terapêuticos que serão co-administrados com o anticorpo biespecífico são preferencialmente agentes quimioterapêuticos utilizados na terapêutica-padrão de linfoma não Hodgkin (LNH), tal como compostos de platina, antraciclinas, agentes de alquilação, antimetabólitos, inibidores de topoisomerase, antibióticos, inibidores de mitose, antitubulinas e similares. Contudo, a co-terapêutica também pode ser feita para reduzir a inflamação. Prefere-se especialmente co-administrar, de

qualquer das maneiras referidas antes, um agente anti-inflamatório, por exemplo, um glicocorticosteróide. Tal como descrito nos exemplos em anexo, antes da administração contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, administrou-se aos doentes 100 mg de esteróide, de modo a suprimir a produção de citocina na fase inicial da administração contínua. Alternativamente, o esteróide pode ser administrado na fase inicial do dia 1 ao dia 4 da administração contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. A dose de esteróide administrada, por exemplo, 1 h antes da infusão contínua no 1º dia pode ser de 500 mg, no 2º dia (após 24 h de infusão contínua) de 250 mg, no 3º dia (após 48h de infusão contínua) de 125 mg e no 4º dia (após 72 h de infusão contínua) de 125 mg. Contudo, também se considera que não se administrou nenhum esteróide antes, durante ou depois da administração contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Obviamente que também se pode administrar em combinação fármacos/agentes quimioterapêuticos e anti-inflamatórios. No caso de ocorrer co-administração durante a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única, de tal modo que a co-administração pode ocorrer durante todo o tempo de administração do referido anticorpo ou apenas para uma ou mais das suas porções. Por exemplo, está dentro do âmbito da presente modalidade da presente invenção que essa co-administração pode começar antes da administração do anticorpo biespecífico de cadeia única e pode terminar após ter começado a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única. Nesse caso, pode ser vantajoso omitir qualquer outra co-administração ao longo do resto da administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única ou pode ser alternativamente

vantajoso resumir a co-administração de um agente farmacêutico numa fase tardia durante e/ou depois da administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única. Também pode ser vantajoso estruturar o regime de co-terapia de tal modo que ocorra a co-administração apenas antes e/ou depois da administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única, mas não durante a administração ininterrupta. Assim, "um regime de co-terapia", no significado da presente modalidade da presente invenção, deve ser entendido como compreendendo, num sentido cronológico, a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única. Isto significa que o regime de co-terapia pode, nalguns casos, ser realizado durante um período mais longo do que a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única, dado que é possível co-administrar um agente farmacêutico como parte da co-terapia antes e/ou depois da administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única. Inversamente, o regime de co-terapia pode ser realizado durante um período mais curto do que a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única, dado que a co-administração do regime de co-terapia pode ter lugar apenas para uma fracção de tempo durante a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única. Preferencialmente, o referido esteróide é administrado de acordo com o esquema e na dose ilustrada nos exemplos ou como indicado antes.

Se a co-administração é feita sob a forma de uma infusão contínua, ao longo de todo o período da administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única de acordo com a presente invenção, ambos os agentes - o que é utilizado para a co-terapia e o anticorpo

biespecífico de cadeia única - podem ser combinados numa solução. O agente utilizado para a co-terapia pode ser adicionado directamente à solução/formulação em que se aplica ao doente o anticorpo biespecífico de cadeia única. Além disso, o agente utilizado para a co-terapia e o anticorpo biespecífico de cadeia única podem também ser aplicados, em paralelo, como soluções separadas ao longo do tempo. A co-terapia pode, nalguns casos, ser vantajosa ou necessária, consoante as outras condições existentes, de que se suspeita ou esperadas no doente que está submetido ao tratamento de acordo com meios e processos farmacêuticos da presente invenção. Essa co-administração pode ocorrer como uma ou mais aplicações de bólus antes, durante e/ou no seguimento da administração ininterrupta, de acordo com meios e processos farmacêuticos da presente invenção. Alternativamente, essa co-administração pode também ser de natureza ininterrupta e pode, neste caso, ter lugar ao mesmo tempo e até no mesmo veículo de administração, sob a forma de administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única, conforme estabelecido no processo, estajo ou utilização de acordo com a presente invenção.

O anticorpo biespecífico de cadeia única, tal como aqui definido e o outro agente terapêutico podem actuar em sinergia. Tal como se utiliza aqui, o termo "sinergia" refere-se a uma combinação de terapias (por exemplo, uma combinação de um anticorpo biespecífico de cadeia única e (a) outros agentes farmacêuticos ou terapêuticos, conforme aqui estabelecido) que é mais eficaz do que os efeitos aditivos de quaisquer duas ou mais terapias individuais (por exemplo, um ou mais agentes farmacêuticos ou terapêuticos. Um efeito sinérgico de uma combinação de

terapias (por exemplo, uma combinação de um anticorpo biespecífico de cadeia única, tal como aqui definido e (a) outros agentes farmacêuticos ou terapêuticos, conforme aqui estabelecido) permite a utilização de doses mais baixas de uma ou mais terapias (por exemplo, um ou mais agentes farmacêuticos ou terapêuticos) e/ou a administração menos frequente das referidas terapias, a um doente com uma doença, por exemplo, LNH B ou leucemias de células B, tal como aqui definido. A capacidade de utilizar doses mais baixas nas terapias (por exemplo, agentes farmacêuticos ou terapêuticos) e/ou de administrar essas terapias menos frequentemente, reduz a toxicidade associada à administração das referidas terapias a um indivíduo, sem reduzir a eficácia das referidas terapias na prevenção ou no tratamento de uma doença, por exemplo, LNH B ou leucemia de células B, tal como aqui definido. Além disso, um efeito sinérgico pode resultar numa maior eficácia das terapias (por exemplo, agentes farmacêuticos ou terapêuticos) na prevenção, gestão, tratamento e/ou melhoria de LNH B ou leucemia de células B, tal como aqui definido. Finalmente, o efeito sinérgico de uma combinação de terapias (por exemplo, agentes farmacêuticos ou terapêuticos) pode evitar ou reduzir efeitos secundários adversos ou indesejáveis com a utilização de qualquer terapia individual.

Noutra modalidade, a co-terapêutica pode ser feita para reduzir a inflamação. Prefere-se especialmente co-administrar, de qualquer das maneiras referidas antes, um agente anti-inflamatório, por exemplo, um glicocorticosteróide.

O regime de co-terapia desta modalidade da presente invenção pode também providenciar, com vantagem, um sinal

de activação para as células imunitárias efectoras, para a proliferação das células ou para a estimulação das células.

A administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única pode ser intravenosa, parentérica, subcutânea, transdémica, intraperitonal, intramuscular ou pulmonar. O modo de administração intravenoso será, na maior parte dos casos, o modo escolhido para a administração ininterrupta do anticorpo biespecífico de cadeia única e, conforme o caso, para a co-administração de um agente farmacêutico, como parte de um regime de co-terapia. Como tal, a administração intravenosa é especialmente preferida. Neste caso, pode-se escolher, com vantagem um dispositivo de medição apropriado, tal como uma bomba de infusão para várias terapias, do modelo 6060, fabricada pela Baxter. Seja qual for o dispositivo escolhido, deve ter um desenho e uma construção que minimize ou melhor que impeça uma interrupção da administração do agente terapêutico no evento de permuta de cartucho e/ou substituição ou recarregamento de bateria. Isto pode conseguir-se, por exemplo, escolhendo um dispositivo com um reservatório secundário da solução do anticorpo biespecífico de cadeia única fora do cartucho a ser trocado, de modo que a infusão contínua a partir deste reservatório secundário, no doente, possa continuar mesmo enquanto o cartucho estiver vazio ou quase vazio foi removido e substituído com um fresco.

Um modo de administração intravenosa e, se for o caso, de administração como parte de um regime de co-terapia envolve a implantação de uma bomba no corpo do doente para medir essa administração. Uma técnica na matéria conhecerá

essas bombas medidoras, por exemplo, o modelo 6060 fabricado, pela Baxter, conforme referido antes.

Como exemplo não limitativo, podemos referir a administração ininterrupta, isto é, a administração contínua que pode ser feita por um sistema com uma pequena bomba usada ou implantada no doente para medir o influxo do agente terapêutico no corpo do doente. Esses sistemas de bombas são no geral conhecidos na técnica e normalmente baseiam-se na troca periódica de cartuchos que contêm o agente terapêutico para a infusão. Quando se troca o cartucho, nesse sistema de bomba, pode acontecer uma interrupção temporária do fluxo supostamente ininterrupto do agente terapêutico para o corpo do doente. Nesse caso, a fase de administração antes da substituição do cartucho e a fase de administração depois da substituição do cartucho serão ainda consideradas dentro do significado dos meios e processos farmacêuticos da presente invenção que, em conjunto, constituem uma "administração ininterrupta" desse agente terapêutico. O mesmo se aplica nas administrações de longo prazo em que o cartucho exigirá uma substituição, mais do que uma vez ou em que as baterias que accionam a bomba exigirão substituição, levando a uma interrupção temporária do fluxo da solução terapêutica para o corpo do paciente.

Devem tomar-se medidas apropriadas para minimizar o perigo de infecção no sítio da punção, para a administração ao corpo do doente, desde que essas feridas, a longo prazo estão especialmente sujeitas a essa infecção. O mesmo se aplica à administração intramuscular por via de um sistema de administração semelhante.

A administração contínua pode ser transdérmica por meio de um adesivo usado na pele e substituídos a intervalos de tempo. Um técnico na matéria conhece os sistemas de adesivos para a administração apropriada de fármacos, para esta finalidade. Deve notar-se que a administração transdérmica é especialmente apropriada para uma administração ininterrupta, dado que a troca de um primeiro adesivo esgotado pode ser feita, com vantagem, simultaneamente com a colocação de um novo segundo adesivo, por exemplo na superfície da pele imediatamente adjacente ao primeiro adesivo esgotado e imediatamente antes da retirada do primeiro adesivo esgotado. As questões de interrupção do fluxo ou de falta de bateria não se põem.

Ainda noutra modalidade preferida, a administração contínua consegue-se por via pulmonar, por exemplo, através de um tubo colocado numa ou nas duas narinas, estando o tubo ligado a um depósito pressurizado, cujo conteúdo é medido com precisão.

Contudo, tal como se ilustra aqui e nos exemplos em anexo, o modo de administração mais preferido é uma administração intravenosa ao longo de um dado tempo/período de tempo.

O anticorpo biespecífico de cadeia única, tal como se utiliza aqui, estará com vantagem sob a forma de uma composição farmacêutica para administração a um doente humano. Embora o anticorpo biespecífico de cadeia única, tal como se utiliza aqui, pode ser administrado isoladamente, preferencialmente administrado num veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Exemplos de veículos apropriados sob o ponto de vista farmacêutico são

bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas, água, lipossomas, vários tipos de agentes de molhagem, soluções esterilizadas, etc. As composições que compreendem esses veículos podem ser formuladas por processos convencionais bem conhecidos. Estas composições farmacêuticas podem ser administradas ao indivíduo numa dose apropriada. O regime de dosagem será determinado pelo médico assistente e por factores clínicos. Como é bem conhecido nas práticas clínicas, as doses para qualquer doente depende de muitos factores, incluindo o tamanho do doente, a área da superfície corporal, a idade, o composto particular a ser administrado, o género, o tempo e a via de administração, o estado geral de saúde e outros fármacos que estejam a ser administrados conjuntamente. As preparações para administração parentérica incluem soluções ou suspensões aquosas ou não aquosas esterilizadas. São exemplos de dissolventes não aquosos o propileno-glicol, o polietileno-glicol e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Os veículos aquosos incluem água, soluções ou suspensões aquosas, incluindo meios salinos e tamponados. Os veículos parentéricos incluem soluções de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio ou Ringer lactado. Os veículos intravenosos incluem recargas de fluidos e de nutrientes, recargas de electrólitos (tal como as que têm por base dextrose de Ringer) e similares. Também podem estar presentes conservantes e outros aditivos tais como, por exemplo, agentes anti-microbianos, anti-oxidantes, agentes quelantes e gases inertes e similares. Além disso, a composição pode conter veículos proteínáceos como, por exemplo, albumina do soro ou imunoglobulina, preferencialmente de origem humana. Considera-se que a composição pode conter, para além do anticorpo biespecífico de cadeia única proteínáceo, outros

agentes activos sob o ponto de vista biológico, consoante a utilização pretendida para a composição farmacêutica. Esses agentes podem ser agentes que actuam como citostáticos, agentes de prevenção da hiperuricémia, agentes de inibição de reacções imunitárias (por exemplo, corticosteróides, FK506), fármacos que actuam no sistema circulatório e/ou agentes tais como moléculas estimuladoras de células T ou citocinas conhecidas na técnica. Preferencialmente, o anticorpo biespecífico de cadeia única, como aqui definido, formula-se num tampão, um estabilizante e um tensioactivo. O tampão pode ser um tampão de fosfato, de citrato, de succinato ou de acetato. O estabilizador pode ser um aminoácido ou um açúcar. Os tensioactivos podem ser detergentes, PEG ou similares. Mais preferencialmente, o anticorpo biespecífico de cadeia única, como aqui definido, formula-se em citrato, lisina tre-halose e Tween 80. como diluente para a composição farmacêutica da presente invenção, prefere-se solução salina isotónica e Tween 80.

Preferencialmente, nas várias utilizações, as estruturas de anticorpo biespecífico de cadeia única para ser utilizada em processos ou estojos da presente invenção, a composição farmacêutica pode ser administrada a um ser humano.

O sucesso da terapêutica com o anticorpo biespecífico de cadeia única pode ser monitorizado por processos normalizados estabelecidos para as respectivas entidades de doença:

Para a terapêutica de leucemias de células B, por exemplo, contagens de glóbulos brancos podem utilizar-se diferenciais, separação de células activada por fluorescência (SCAF), aspiração de medula óssea e

vários parâmetros químicos clínicos específicos da leucemia e outros processos-padrão estabelecidos. Para a terapêutica do linfoma das células B, pode-se utilizar, por exemplo, tomografia assistida por computador, raios X, tomografia por ressonância magnética nuclear (por exemplos para avaliação de respostas com base nos critérios do National Cancer Institute (Cheson (1999), J. Clin. Oncol.; 17(4): 1244), rastreio por tomografia de emissão de positrões, contagem de glóbulos brancos, diferenciais, separação de células activada por fluorescência, aspiração de medula óssea, biópsias/histologia de nódulos linfáticos e vários parâmetros químicos clínicos específicos da leucemia (por exemplo, lactato-desidrogenase) e outros processos-padrão estabelecidos.

A citotoxicidade pode ser detectada por processos conhecidos na técnica e processos como os que se ilustram aqui a seguir e nos exemplos em anexo.

Figura 1: Estudos de escalonamento da dose de anticorpos biespecíficos de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3) administrados intravenosamente a um doente com recaída de um linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) - efeito sobre as contagens de linfócitos periféricos CD3+, CD4+ e CD8+. O doente 0202 com um diagnóstico de recidiva de LNH de células B recebeu seis administrações intravenosas de bscCD19xCD3, ao longo de 4 horas, num regime de tratamento de duas vezes por semana. A dose de bscCD19xCD3 foi escalonada nas seguintes doses: 1, 2, 4, 7, 10 e 13 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ da área da superfície corporal. O número de linfócitos T CD3+ (losangos cinzentos),

linfócitos T CD4+ (quadrados negros) e linfócitos T CD8+ (triângulos negros) indicados como percentagem do número total de linfócitos foi determinado por citometria de fluxo antes e ao fim de 4 h de infusão nos dias 0, 2, 7, 9, 14 e 16, respectivamente. Os períodos de infusão de 4 h estão indicados por setas e barras cinzentas.

Figura 2: Estudos de escalonamento da dose de anticorpos biespecíficos de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3) administrados intravenosamente a um doente com uma doença maligna refractária de células B - efeito nas concentrações de FNT alfa no soro. O doente 1003 com um diagnóstico de linfoma das células do manto (LCM) recebeu seis infusões de 1,5 (dose inicial no dia 0) e 3 µg (dose de manutenção nos dias do estudo que se seguiram) de bscCD19xCD3, ao longo de quatro horas, nos dias 0, 2, 4, 14, 16 e 18 do estudo. As concentrações de FNT alfa no soro foram determinadas antes de depois de um período de infusão de 4 h. Os períodos de infusão de 4 h estão indicados por setas e barras cinzentas.

Figura 3: O estudo de escalonamento da dose de bscCD19xCD3 administrado intravenosamente ao doente 1003, conforme indicado na legenda da figura 2 - efeito das concentrações de IFN gama no soro.

Figura 4: O estudo de escalonamento da dose de bscCD19xCD3 administrado intravenosamente ao doente 1003, conforme indicado na legenda da figura 2 - efeito das concentrações de IL-6 no soro.

Figura 5: O estudo de escalonamento da dose de bscCD19xCD3 administrado intravenosamente ao doente 1003, conforme indicado na legenda da figura 2 - efeito das concentrações de IL-10 no soro.

Figura 6: Análise das contagens das células T $CD3^+$ / $CD8^+$ e $CD3^+$ / $CD4^+$. As células T $CD8^+$ e $CD4^+$ dispersam-se bastante do sangue periférico após o início da infusão de bscCD19xCD3, o que se explica pelo fenómeno distribucional provocado pela activação das células T através da reticulação mediada por bscCD19xCD3 das células T e B do sangue periférico. Contudo, após meia semana de tratamento, as células T $CD8^+$ e $CD4^+$ reaparecem no sangue e o seu número aumenta até aos 7^º e 21^º dias, respectivamente. Em comparação com os valores iniciais, as células T $CD8^+$ e $CD4^+$ mostraram um aumento no sangue de 3,5 a 4 vezes. As contagens das células T $CD8^+$ e $CD4^+$ permaneceram elevadas durante as 2 e 3 semanas de tratamento, antes do número de células T diminuir durante a quarta semana de tratamento. As contagens das células T $CD8^+$ e $CD4^+$ permaneceram ainda acima dos valores correspondentes pré-tratamento com bscCD19xCD3, quando se diagnosticou uma diminuição substancial do tumor, preenchendo assim os critérios de resposta parcial.

Figura 7: Análise das sub-populações das células T $CD8^+$. O sub-conjunto da memória efectora TEM foi quase exclusivamente o responsável pela expansão das células T $CD8^+$ T induzida por bscCD19xCD3. A contagem das células T $CD8^+$ no que respeita à maior parte da actividade citotóxica, entre todas as células T e as células de TEM, em conjunto com a maior parte da

actividade citotóxica entre as células T CD8⁺. Excepto no que respeita ao sub-conjunto de TEM, não se observaram alterações significativas nas contagens de células entre as outras sub-populações de células T CD8⁺ como as células T maduras que não são capazes de proliferar depois de uma única activação, conforme providenciado por bscCD19xCD3 ou o sub-conjunto de TEMRA que não é mesmo capaz de proliferar. Assim, a expansão selectiva das células TEM CD8⁺, concorrentes com a proliferação, pode ser claramente atribuída à divisão e proliferação das células em resposta ao contacto das células TEM CD8⁺ com as células B de linfoma comportando bscCD19xCD3 dentro do tumor. Pode-se excluir uma contribuição significativa para a expansão das células T das células B de linfoma comportando o bscCD19xCD3 em circulação no sangue porque já se tinha feito a depleção das células B de linfoma em circulação, a partir do sangue periférico, no 3º dia, isto é, antes de se observar a expansão das células T.

Figura 8: Análise dos marcadores de activação de células T CD8⁺. A expansão das células T CD8⁺ é precedida de uma forte actividade das células T CD8⁺ conforme indicado por uma regulação sustentada do marcador de activação HLA-DR. Outros marcadores de activação como CD69 e CD25 apenas exibiram uma curta regulação temporária após o início da infusão de bscCD19xCD3, o que se explica pela activação através das células B de linfoma comportando o bscCD19xCD3 em circulação no sangue porque já se tinha feito a depleção das células B de linfoma em circulação, a partir do sangue periférico, nos primeiros 3 dias de

tratamento. Ao contrário, a regulação sustentada de HLA-DR, ao longo de 3 semanas reflecte a activação das células T CD8⁺ no tumor através do contacto com as células B de linfoma residentes no tumor que comportam bscCD19xCD3. A activação intra-tumoral das células T resulta numa resposta proliferativa das células T dentro do tumor, o que leva à expansão das células T que, secundariamente, também aparecem no sangue em circulação. Essas células T activadas no tumor e que migram depois para o sangue ainda exibem o marcador de activação de longo prazo HLA-DR, mas já desregularam os marcadores de activação de curto prazo CD69 e CD25.

Figura 9: Contagens das células B do doente #105003. A doente começou com cerca de 140 células B (linfoma) por ml de sangue, antes do tratamento. Após o início da infusão, a circulação de células B (linfoma) caiu rapidamente nos primeiros 3 dias de tratamento e finalmente desapareceu completamente do sangue periférico no fim da primeira semana de tratamento. Assim, bscCD19xCD3 pode eliminar completamente as células B (linfoma) em circulação, devido à sua actividade citotóxica contra as referidas células.

Figura 10: (A) Medição da dimensão das lesões de linfoma #2 (conforme estabelecido no quadro na figura 10(B)) antes (painel da esquerda; 26.09.05) e depois (painel da direita; 31.10.05) de 4 semanas de tratamento com bscCD19xCD3, por tomografia computadorizada (TC). (B) A redução da dimensão do linfoma, tal como se mostrou em (A) foi quantificada como se descreve no quadro mostrado em (B), em conjunto com cinco outras lesões seleccionadas para eficácia da

avaliação. A redução toral da dimensão do linfoma é expressa como o decréscimo, em percentagem da soma dos produtos com os maiores diâmetros da secção transversal (isto é, a soma dos diâmetros das lesões SDL) de seis lesões de linfoma seleccionadas. De acordo com isto, pode-se diagnosticar uma diminuição de 58,0 % do linfoma que preenche os critérios de uma resposta parcial (RP).

Figura 11: Contagens das células B do doente #102003. A doente começou com 920 células B (linfoma) por ml de sangue, antes do tratamento. Depois de se iniciar a infusão de bscCD19xCD3, a circulação de células B (linfoma) no sangue mostrou um rápido decréscimo no seguimento de uma fase temporária de recuperação a 600 células por ml, nos primeiros 3 dias, o que é consistente com a redistribuição das células. No seguimento do tratamento, as células B (linfoma) desapareceram completamente da circulação até se diagnosticar uma resposta parcial (RP), passadas 2 semanas de tratamento. Estes dados confirmam que bscCD19xCD3 é capaz de eliminar completamente as células B (linfoma) da circulação, como parte da sua eficácia clínica.

Figura 12: Histopatologia da medula óssea do doente #102003 antes e após 2 semanas de tratamento com bscCD19xCD3.

O painel da esquerda - antes do tratamento com bscCD19xCD3: A medula óssea mostra 40-50 % de infiltração da medula óssea por células linfocíticas pequenas de linfoma. Painel da direita - passadas duas semanas do tratamento com bscCD19xCD3: Não há

evidências de que se possa encontrar mais infiltração com células linfocíticas pequenas de linfoma, onde se pode observar um aumento significativo de células T.

Figura 13: (A) Medição da dimensão das lesões de linfoma do mediastino do doente #102003 (conforme estabelecido no quadro na figura 13(B)) antes (painel da esquerda; 02.05.05) e depois (painel da direita; 31.05.05) de 2 semanas depois do tratamento com bscCD19xCD3, por tomografia computadorizada (TC). (B) A redução da dimensão do linfoma, tal como se mostrou em (A) foi quantificada como se descreve no quadro mostrado em (B), em conjunto com duas outras lesões de linfoma (retroperitoneal e mesentérica), seleccionadas para eficácia da avaliação. A redução toral da dimensão do linfoma é expressa como o decréscimo, em percentagem da soma dos produtos com os maiores diâmetros da secção transversal (isto é, a soma dos diâmetros das lesões SDL) de seis lesões de linfoma seleccionadas. De acordo com isto, pode-se diagnosticar uma diminuição de 57,2% do linfoma que preenche os critérios de uma resposta parcial (RP).

Figura 14: A expansão de células T CD8⁺ está relacionada com diferentes respostas clínicas. Os percursos das células dos sub-conjuntos de TEM CD8⁺ estão ilustrados para 2 doentes, isto é, os doentes # 109002 (resposta completa) e # 105003 (resposta parcial) que atingiram diferentes respostas clínicas. Também se descreve a contribuição da primeira e segunda das 4 semanas de tratamento, respectivamente, para a resposta clínica global, assim como a área sob a curva (ASC) do sub-conjunto de TEM para as primeiras 4

semanas. A contribuição máxima para a resposta clínica dos doentes ocorre nas primeiras 4 semanas de tratamento e está bastante relacionada com a expansão do sub-conjunto de TEM CD8⁺. A proliferação destas células T altamente citotóxicas parece ser um pré-requisito para um benefício clínico, conforme sublinhado pelas observações tanto do número absoluto de células atingido durante a expansão, como o seu aumento relativo, em comparação com os níveis pré-tratamento que contribuem para uma resposta clínica ótima.

Figura 15: Linfoma do ilíaco detectado por rastreio por TC (marcado por um círculo) no doente # 109002: Dimensão antes do tratamento com anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD 19 x anti-CD3 – 3,2 x 2,2 cm². A mesma lesão de linfoma decresceu a sua dimensão para 1,7 x 1,2 cm² após 4 semanas de infusão contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Passadas 8 semanas de infusão contínua do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 o linfoma tinha desaparecido, isto é, a dimensão dos nódulos linfáticos tinha normalizado para o normal (0,8 x 0,8 cm²).

Figura 16: A infusão contínua de anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 ao doente # 109002 normalizou a dimensão do baço, que tinha alargado massivamente antes do tratamento.

A presente invenção vai agora ser descrita com referência aos exemplos que se seguem que são meramente

ilustrativos e não foram construídos como uma limitação ao âmbito da presente invenção.

Exemplo 1:

1. Preparação de anticorpos biespecíficos de cadeia única de CD19xCD3 and CD3xCD19 que compreendem vários re-arranjos de domínios.

Geralmente, as moléculas de anticorpo bi-específicas, de cadeia simples, compreendendo, cada uma, um domínio com uma especificidade de ligação para os antígenos de CD3 de seres humanos, assim como um domínio com uma especificidade de ligação para o antígeno de CD19 humano, foram concebidas como se explicita no quadro 1 que se segue:

Quadro 1: Formatos de moléculas de anticorpo biespecífico de cadeia simples, compreendendo especificidades anti-CD3 e anti-CD19

Número da estrutura	SEQ ID Nos (nucl/prot)	Formatos das estruturas de proteínas (N-C)
1	1/2	VL(CD19)-VP(CD19)-VP(CD3)-VL(CD3)
2	3/4	VP(CD19)-VP(CD19)-VP(CD3)-VL(CD3)
3	5/6	VP(CD3)-VL(CD3)-VP(CD19)-VL(CD19)
4	7/8	VP(CD3)-VL(CD3)-VL(CD19)-VP(CD19)

Clonaram-se os domínios variáveis de cadeia leve (VL) e de cadeia pesada (VP) do hibridoma HD37 (Pezzutto, J. Immunol. 138 (1997), 2793-9) de acordo com processos-padrão de RCP (Orlandi, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 86 (1989), 3833-7). Fez-se a síntese de ADNc com os iniciadores de oligo dT e a polimerase Taq. Para a amplificação dos domínios anti-CD19 V por via da RCP, utilizaram-se os iniciadores 5' L1 (SEQ ID NO: 19) e 3' K (SEQ ID NO: 20), que flanqueiam o domínio VL e 5'H1 (SEQ ID NO: 21) e 3'G (SEQ ID NO: 22) para a cadeia pesada, com base nos

iniciadores descritos por Dübel, J. Immunol. Methods 175 (1994), 89-95. O ADNc do fragmento scFV anti-CD3 foi gentilmente cedido por Traunecker (Traunecker, EMBO J. 10 (1991) 3655-9).

A estrutura 1, tal como está estabelecida no quadro 1, foi gerada como se segue. Para se obter um fragmento scFV anti-CD19, clonaram-se as regiões VL e VP correspondentes em vectores separados de plasmidos que serviram como matrizes para a RCP específica de VL e VP, utilizando os pares de iniciadores de oligonucleótidos 5'VLB5RRV (SEQ ID NO: 23) / 3'VLGS15 (SEQ ID NO: 24) e 5'VPGS15 (SEQ ID NO: 25) / 3'VPBspE1 (SEQ ID NO: 26), respectivamente.

Introduziram-se as sequências complementares de sobreposição nos produtos da RCP que se combinaram para formar a sequência de codificação de 15 ligantes de aminoácidos (Gly₄Ser₁)₃ durante a subsequente fusão da RCP. Esta etapa de amplificação foi realizada com o par de iniciadores 5'VLB5RRV (SEQ ID NO: 23) / 3'VPBspE1 (SEQ ID NO: 26) e clivou-se o produto resultante da fusão (ou então um fragmento scFv anti-CD19) com as enzimas de restrição EcoRV e BspE1 e assim clonou-se no vector de bluescript KS (Stratagene), contendo a sequência de codificação (EcoR1/Sal1 clonado) do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-17-1A/anti-CD3 (actualmente a versão sem o marcador Flag) (Kufer, Cancer Immunol. Immunother. 45 (1997), 193). Depois substituiu-se a especificidade anti-17-1A pelo fragmento scFV anti-CD19, conservando o ligante de 5 aminoácidos Gly₄Ser que liga o fragmento scFV anti-CD3 do terminal C. Em seguida, sub-clonou-se o fragmento de ADN que codifica o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19/anti-CD3 com o arranjo do domínio VL_{CD19}-VP_{CD19}-VP_{CD3}-

VL_{CD3} em sítios EcoR1/Sal1 do vector de expressão pEF-DHFR descrito (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 92 (1995) 7021-5). Transfectou-se o ADN do plasmido resultante em células de OHC deficientes em DHFR, por electroporação. Realizou-se a selecção, a amplificação de fenes e a produção de proteínas, tal como foi previamente descrito (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 92 (1995) 7021-5). A sequência de ADN correspondente à estrutura 1, tal como estabelecida antes no quadro 1, está representada na SEQ ID NO: 1. A tradução da proteína desta sequência de ADN (com líder) está representada na SEQ ID NO: 2. As estruturas remanescentes estão indicadas antes no quadro 1 e foram preparadas como se segue. A sequência de ADN correspondendo à SEQ ID NO: 1 (estrutura 1), cuja tradução da proteína está representada pela SEQ ID NO: 2 foi utilizada como matriz de RCP na concepção dos vários anticorpos biespecíficos de cadeia única anti-CD3 / anti-CD19, tal como estabelecido no quadro 1. Para gerar um arranjo de VP-VL de CD19 nas posições A1 e A2 (tal como definido nas figuras 1A e 1B de WO2004/106381), utilizou-se a RCP com a respectiva combinação de iniciadores 5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36) e 3'VPCD19GS15 (SEQ ID NO: 37) ou 5'VLCD19GS15 (SEQ ID NO: 38) e 3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39). Durante estes ciclos de RCP introduziram-se, nos produtos de RCP, sequências complementares, formando a sequência de codificação de um ligante de 15 aminoácidos, durante a subsequente RCP de fusão. Os domínios VL e VP amplificados fundiram-se numa segunda reacção de RCP (RCP de fusão) na qual são necessários apenas os iniciadores externos, nomeadamente 5'VHCD19BsrGI (SEQ ID NO: 36) e 3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39) e ambos os amplicões. Utilizou-se um procedimento similar utilizando outras combinações de iniciadores para construir outros arranjos do domínio. Concebeu-se um

conjunto apropriado de iniciadores para realizar as etapas de clonagens múltiplas à base de RCP, o que resultou finalmente nos vários arranjos dos domínios VL-VP. As combinações utilizadas de iniciador estão listadas no quadro que se segue:

Quadro 2: Visão geral das etapas de clonagem à base de RCP utilizadas para a construção das estruturas 1 a 4 das posições A1 e A2, como se mostra no quadro 1

Etapa de RCP	Iniciadores utilizados		Etapa de RCP	Iniciadores utilizados	Ordem de domínios resultantes do terminal N
RCP A1	5'VPCD19BsrG (SEQ ID NO: 36)	3'VPCD19GSI 5 (SEQ ID NO: 37)	RCP de fusão A1 + A2	5'VPCD19BsrG (SEQ ID NO: 36)	VP-VL de CD19
RCP A2	5'VLCD19GSI (SEQ ID NO: 38)	3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)	3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 39)		
RCP A1	5'VPL2KBSrGI (SEQ ID NO: 32)	3'VPL2KGS15 (SEQ ID NO: 33)	RCP de fusão A1 + A2	5'VPL2KBSrGI (SEQ ID NO: 32)	VH-VL anti-CD3
RCP A2	5'VLL2KGS15 (SEQ ID NO: 34)	3'VLL2KBSpEI (SEQ ID NO: 35)	3'VLL2KBSpEI (SEQ ID NO: 35)		
RCP A1	5'VLL2KBSrGI (SEQ ID NO: 40)	3'VLL2KGS15 (SEQ ID NO: 41)	RCP de fusão A1 + A2	5'VLL2KBSrGI (SEQ ID NO: 40)	VL-VP anti-CD3
RCP A2	5'VPL2KGS15 (SEQ ID NO: 42)	3'VPL2KBSpEI (SEQ ID NO: 43)		3'VPL2KBSpEI (SEQ ID NO: 43)	

Para alterar o arranjo do domínio VPH-VL na posição do terminal C, nomeadamente nas posições B1 e B2, tal como definido nas figuras 1A e 1B de WO2004/106381, conceberam-se os iniciadores que se seguem compreendendo os designados sítios de reconhecimento da enzima de restrição, para realizar as etapas de clonagem à base RCP.

Quadro 3: Visão geral das etapas de clonagem à base de RCP utilizadas para a construção das estruturas 1 a 4 das posições B1 e B2, como se mostra no quadro 1

Etapa de RCP	Iniciadores utilizados	Ordem de domínios resultantes do terminal C
--------------	------------------------	---

RCP B1 + B2	5' VLCD19BspEIGS (SEQ ID NO: 31)	3'VPCD19BspEI (SEQ ID NO: 44)	VL-VP de CD19
	5'VPCD19BspEIGS (SEQ ID NO: 29)	3'VLCD19BspEI (SEQ ID NO: 30)	VP-VL de CD19
	5'VLL2KBspEIGS (SEQ ID NO: 27)	3'VPL2KBspEI (SEQ ID NO: 28)	VL-VP anti- CD3

O produto de RCP correspondente, que estava flanqueada por dois sítios BspEI foi clonado num plasmido designado por BS-CTI, que foi digerido com as enzimas de restrição BspEI e XmaI. Inseriu-se um poli-ligante designado por CTI (SEQ ID NO: 45) antes do vector Bluescript KS (GenBank com o número de acesso X52327) utilizando os sítios de clivagem da enzima de restrição XbaI e SalI, de modo a providenciar sítios adicionais de clivagem, assim como a sequência que codifica um ligante de G₄S, seis resíduos consecutivos de histidina e um codão de paragem. Durante esta etapa de clonagem, o sítio BspEI do domínio VP fundiu-se com o sítio XmaI do plasmido, destruindo assim ambos os sítios. A orientação correcta do domínio variável foi verificada pela sequenciação de acordo com protocolos-padrão.

Todos os procedimentos moleculares indicados antes foram feitos de acordo com protocolos-padrão descritos em Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3ª edição, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001).

Transfectou-se o ADN que codifica os anticorpo biespecífico de cadeia única no quadro 1 (SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7) com células de OHC deficientes em DHFR, para a expressão de proteínas de células eucarióticas em células

de OHC deficientes em DHFR, tal como descrito em Mack et al. (Mack, Proc Natl Acad Sci EUA 92, (1995), 7021-25). A amplificação dos genes da estrutura foi induzida por concentrações crescentes de metotrexato (MTX) até a uma concentração final de 20 nM de MTX. As células transfectadas expandiram-se e produziu-se 1 litro de sobrenadante.

2. Expressão e purificação dos anticorpos biespecíficos de cadeia única dirigidos contra CD3 e CD19

Os anticorpos bi-específicos de cadeia simples foram expressas em células de ovário de hamster chinês (OHC). A transfecção do vector foi feita no seguimento do tratamento das células com fosfato de cálcio ("Molecular Cloning", Sambrook et. al. 1989). As células cresceram em garrafas rolante com meio DMEM modificado com OHC (HiQ®, HiClone), durante 7 dias, antes de serem colhidas. Removeram-se as células por centrifugação e armazenou-se o sobrenadante contendo a proteína expressa, a -20 °C.

Para a cromatografia utilizou-se o sistema Äkta® FPLC (Pharmacia) e o programa informático Unicorn®. Todos os produtos químicos eram de grau de investigação e foram comprados à Sigma (Deisenhofen) ou Merck (Darmstadt). Fez-se a cromatografia por afinidade de metal imobilizado ("CAMI") utilizando uma coluna Fractogel® (Merck) que se carregou com $ZnCl_2$, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Equilibrou-se a coluna com tampão A2 (tampão de fosfato de sódio 20 mM, a pH 7,5, NaCl 0,4 M) e aplicou-se à coluna (10 ml) o sobrenadante (500 ml) da cultura de células, a uma velocidade de fluxo de 3 ml/min. Lavou-se a coluna com tampão A2 para remover a amostra não

ligada. A proteína ligada foi eluída utilizando um gradiente, em 2 etapas, de tampão B2 (tampão de fosfato de sódio 20 mM, a pH 7,5, NaCl 0,4 M, imidazol 0,5 M), de acordo com o seguinte:

Etapa 1: tampão B2 a 20 % em 6 volumes de coluna

Etapa 2: tampão B2 a 100% em 6 volumes de coluna

Aglutinaram-se as fracções de proteínas eluídas da etapa 2, para posterior purificação.

A cromatografia por filtração em gel foi realizada numa coluna Sephadex S200 HiPrep (Pharmacia) equilibrada com STF (Gibco). As amostras de proteína eluída (velocidade de fluxo de 1 ml/min) foram submetidas a uma EGPA-SDS e uma "Western blot", para detecção. Antes da purificação, calibrou-se a coluna para a determinação do peso molecular (estojo de marcador de peso molecular, Sigma MW GF-200). Determinou-se a concentração de proteína utilizando um corante de ensaio de proteínas (MicroBCA, Pierce) e IgG (Biorad) como uma proteína-padrão.

Isolaram-se os anticorpos biespecíficos de cadeia única num processo de purificação em duas etapas de IMAC e filtração em gel. O produto principal tem um peso molecular de cerca de 52 kDa, em condições naturais, conforme determinado por filtração em gel em STF. Este peso molecular corresponde ao anticorpo biespecífico de cadeia única. Todas as estruturas foram purificadas de acordo com este processo.

Analizou-se a proteína de anticorpo biespecífico, de cadeia simples, purificada, por meio de uma EGPA-SDS, em

condições de redução, feita com os géis pre-cast 4-12 % Bis Tris (Invitrogen). A preparação e a aplicação da amostra foram feitas de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Determinou-se o peso molecular com o padrão de proteína MultiMark (Invitrogen). Corou-se o gel com Coomassie coloidal (protocolo da Invitrogen). A pureza da proteína isolada foi > 95 %, conforme se determinou por EGPA-SDS.

Realizou-se a "Western blot" utilizando uma membrana Optitran® BA-S83 e o módulo Blot da Invitrogen, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Os anticorpos utilizados foram dirigidos contra o marcador de histidina 6 (Penta His, Qiagen) e Ig de cabra anti-murganho marcada com fosfatase alcalina (FA) (Sigma) e BCIP/NBT (Sigma) como substrato. O anticorpo biespecífico de cadeia única podia ser especificamente detectado por "Western blot". Detectou-se uma única banda a 52 kD correspondendo à molécula bi-específica purificada.

3. Análises da ligação, por citometria de fluxo, dos polipéptidos específicos de CD19xCD3

Para analisar a funcionalidade das estruturas no que respeita à capacidade de ligação a CD19 e CD3, realizou-se uma análise de SCAF. Com esta finalidade utilizaram-se células NALM-6 positivas para CD19 (células B humanas precursoras de leucemia) e células de Jurkat positivas para CD3 (células B humanas de leucemia). Incubou-se, respectivamente, 200 000 células de NALM-6 e 200 000 células de Jurkat, durante 30 min, em gelo, com 50 µl de sobrenadante puro de células de culturas de células de OHC,

cada uma delas expressando anticorpo biespecífico de cadeia única com diferentes arranjos dos domínios VP e VL de CD19 e CD3 (tal como descrito na secção 2, supra). Lavaram-se as células, duas vezes, em STF e detectou-se a ligação da estrutura como se segue. Fez-se contactar as células tratadas tal como descrito antes com um anticorpo Penta His de murino não marcado (diluído a 1:20 em 50 µl de STF com 2 % de SBF; Qiagen; encomenda no. 34660), que se liga especificamente à estrutura ligada à célula por via do marcador de histidina do terminal C. Seguiu-se uma etapa de lavagem para eliminar o anticorpo Penta His de murino não ligado. Detectaram-se os anticorpos anti-His ligados com um anticorpo específico de Fc gama (Dianova) conjugado com ficoeritrina, diluído em STF a 1:100 com SBF a 2 %. Como controlo negativo, utilizou-se um meio de cultura fresco em vez do sobrenadante da cultura.

Analísaram-se as células por citometria de fluxo num aparelho SCAF-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg). A coloração por SCAF e a medição da intensidade da fluorescência foram feitas como se descreve em Current Protocols in Immunology (Coligan, Kruisbeek, Margulies, Shevach and Strober, Wiley-Interscience, 2002). A capacidade de ligação de vários arranjos do domínio foram claramente detectáveis tal como se mostra na WO2004/106381. Na análise por SCAF todas as estruturas com arranjos diferentes dos domínios VP e VL, específicos para CD19 e CD3 mostraram ligação a CD3 em comparação com o controlo negativo, utilizando meio de cultura e o anticorpo de detecção 1. e 2. Observou-se uma actividade de ligação forte resultando numa deslocação da intensidade de fluorescência $> 5 \times 10^1$ para as estruturas referidas no quadro 1.

4. Bioactividade de anticorpos biespecíficos de cadeia única para CD19 e CD3

Determinou-se a actividade citotóxica dos anticorpos biespecíficos com os dominios VP e VL re-arranjados num ensaio de citotoxicidade à base do fluorocromo libertado. Utilizaram-se como células-alvo (1.5×10^7) células NALM-6 positivas para CD19, marcadas com calceína AM $10 \mu\text{M}$ (Molecular Probes, Leiden, Holanda, no. C-1430), durante 30 min, a 37°C , em meio de cultura de células. Após duas lavagens em meio de cultura de células, contaram-se as células e misturaram-se com células CB15 de clones de células T positivas para CD4 (gentilmente cedidas pelo Dr. Fickenscher, University of Erlangen/Nuernberg, Alemanha). Misturou-se 2×10^6 células CB15 e 2×10^5 células NALM-6 por ml (proporção de E:T de 1:10) e utilizou-se 50 μl desta suspensão por cada poço de uma placa de fundo redondo de 96 poços. Diluíram-se os anticorpos em RPMI/SBF a 10 % para as concentrações requeridas e adicionou-se 50 μl desta solução à suspensão de células. Fez-se a incubação de uma mistura reaccional-padrão a 37°C /em CO_2 a 5 %, durante 2 horas. Após a reacção citotóxica, pode-se quantificar o corante libertado no meio de incubação com um contador de fluorescência (Tecan, Crailsheim, Alemanha) e comparar com o sinal de fluorescência de uma mistura reaccional de controlo (sem anticorpo biespecífico) e o sinal de fluorescência obtido para as células completamente lisadas (durante 10 min em saponina a 1 %). Com base nestas leituras, calculou-se a citotoxicidade específica, de acordo com a seguinte fórmula:
$$\frac{[\text{Fluorescência (amostra)} - \text{Fluorescência (controlo)}]}{[\text{Fluorescência (lise total)} - \text{Fluorescência (controlo)}]} \times 100.$$

As curvas sigmoidais de resposta à dose normalmente tinham valores de $R^2 > 0,97$ conforme determinado pelo programa informático Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os valores de CE_{50} calculados pelo programa de análise foram utilizados para comparação da bioactividade. Tal como se mostra em WO2004/106381, todas as estruturas revelaram actividade citotóxica contra células NALM-6 que expressam CD19. A bioactividade mais forte, com valores de $CE_{50} < 500$ pg/ml foi detectada para as estruturas ilustradas no quadro 1, supra.

Exemplo 2:

Utilização clínica de bscCD19xCD3 num doente com linfoma de células B

Numa utilização para aliviar o sofrimento, uma doente (do género feminino, nascida em 1937) sofrendo de leucemia linfática crónica derivada de células B (LLC-B) tinha sido tratada com o anticorpo biespecífico de cadeia única bscCD19xCD3 (SEQ ID NO.2), tal como descrito em detalhe em WO 99/54440. A análise por SCAF revelou que 95 % das células de sangue periférico dos doentes eram células positivas a CD19, enquanto 77 % das células expressavam o antígeno CD20. A incubação de células de sangue periférico dos doentes com bscCD19xCD3 mostrou uma diminuição pronunciada da quantidade de células B positivas para CD19. Para prevenir quaisquer reacções agudas de citocina e complicações de lise do tumor, o paciente tomou doses profilácticas de IV, de 2 mg de clemastina (Tavegil®) e 200 mg de cimetidina (Tagamet®) assim como 300 mg de alopurinol e 20 mg de omeprazol (Antra®).

O doente recebeu uma primeira dose de 3 µg de bscCD19xCD3 sob a forma de uma infusão de 20 min em tampão isotónico de fosfato contendo 5 % de albumina de soro humano (ASH). Durante a infusão o doente não experimentou quaisquer efeitos adversos. Cerca de 1 hora após a infusão o doente teve arrepios durante cerca de 5 minutos seguido de suores, uma descida moderada da pressão sanguínea para cerca de 10 mm Hg e um aumento moderado da temperatura corporal (+ 0,5 °C) durante algumas horas. Além disso, a dor de cabeça piora ligeiramente. Tratou-se a doente com mais 2 mg de Tavegil® e 200 mg de Tagamet®, 250 mg de prednisolona (Solu-Decortin®) e 50 mg petidina (Dolantin®). Todos os sintomas desaparecem, sem sequelas, no mesmo dia. Um dia mais tarde deu-se uma segunda dose de 10 µg bscCD19xCD3, nas mesmas condições referidas antes. Cerca de 1 hora após a infusão os doentes tiveram arrepios significativos, febre (39,2 °C), hiperventilação ligeira e uma reacção de hipotensão. A doente foi tratada com 2 mg de Tavegil, 200 mg de Tagamet e 300 mg de Solu-Decortina e 15 mg de piritramida (Dipidolor®). Para a estabilização da sua função cardiovascular a doente recebeu uma infusão de dopamina e obteve uma substituição do volume. No seguimento deste tratamento os sintomas diminuíram acentuadamente. Nos 3 dias que se seguiram a doente continuou a ter uma temperatura sub-febril (cerca de 37,2 °C) e desenvolveu uma efusão pleural menor no dia a seguir à segunda dose e um edema ligeiro nas extremidades inferiores.

O exame por ultra-sons (ecografia) do baço e de cinco nódulos linfáticos abdominais foi feito um dia e 4 dias após a administração da segunda dose de bscCD19xCD3. Apenas um dia após a dose de 10 µg, os nódulos linfáticos assim

como o baço mostraram uma diminuição de volume de cerca de 20 %, em comparação com a dimensão dos nódulos linfáticos e do baço, antes do tratamento. Esta observação foi confirmada numa segunda avaliação por ultra-sons. O peso do baço decresceu 350 g (de 1 630 g antes do tratamento para 1 280 g após tratamento).

O número de glóbulos brancos, que incluem maioritariamente células B malignas, decresceu durante o decurso do tratamento e nos dias de seguimento. A proteína C reactiva (PCR) é uma proteína da reacção da fase aguda que reflecte a activação das células T e o efeito das citocinas pró-inflamação. Aumentou marcadamente depois da administração de 10 µg de bscCD19xCD3, seguido de uma diminuição contínua durante os 3 dias de observação que se seguiram.

O nível de citocinas no soro, que reflecte a resposta imunológica aguda à administração do composto, foi medido antes e a vários intervalos após a administração do composto. Mediram-se os níveis de citocinas no soro por meio de um ensaio quantitativo de ELISA, de acordo com as instruções do fabricante. O factor de necrose do tumor FNT α aumentou significativamente de uma forma dependente da dose na primeira hora após a administração de bscCD19xCD3. A interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8) também exibiram um aumento significativo e dependente da dose. Observaram-se os níveis máximos 2 a 4 horas após a administração de bscCD19xCD3.

Em conclusão, administrou-se bscCD19-CD3 de forma segura a um doente que sofria de LLC B refractária. Embora tenham sido observados efeitos secundários adversos, muito

provavelmente devidos à libertação de citocinas, a tolerância a bscCD19xCD3, em doses de 3 µg e de 10 µg, foi aceitável e podem ser bem controladas por meio de medições profilácticas e tratamento sintomático. É importante notar que bscCD19xCD3 causou uma diminuição de volume do baço previamente aumentado e dos nódulos linfáticos do doente, como se demonstrou no exame por ultra-sons. Dado que o aumento do baço e dos nódulos linfáticos seja causado por infiltrações com células B malignas, a diminuição do volume reflecte a destruição de células B malignas, em resultado da administração de bscCD19xCD3.

Exemplo 3:

Estudo de escalonamento da dose da fase I - doente 0202

A finalidade deste estudo de escalonamento da dose da fase I foi investigar a dependência da dose das alterações da actividade imunológica em tecido-alvo de tumor de doentes com linfoma não Hodgkin (LNH) de células B reincidente. Com esta finalidade, cada doente seguiu um esquema de tratamento em que recebeu seis administrações intravenosas de anticorpo biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2; ver também WO 99/54440), ao longo de 4 horas, num regime de tratamento de uma vez ou duas vezes por semana, nos dias 0, 2, 7, 9, 14 e 16. A dose anti-CD19 x anti-CD3 foi escalonada, intra-individualmente, nas seguintes doses: 1, 2, 4, 7, 10 e 13 µg/m² da área da superfície corporal. Para avaliar a influência de doses escaladas de bscCD19xCD3 no número e na distribuição de sub-conjuntos de linfócitos em circulação, recolheram-se amostras de sangue completo antes e durante a administração. Determinou-se o número total de linfócitos

pela análise diferencial da contagem do sangue e do número de sub-populações de linfócitos determinados por análise por SCAF e expressas como a percentagem total de linfócitos, tal como descrito no exemplo 2. Em particular, os números de células T CD3+, CD4+ e CD8+, nas células mononucleares do sangue periférico, foram determinados por meio de separação de células activada por fluorescência (SCAF). Como exemplificado na figura 1 para uma doente (isto é, a doente 0202) que completou a fase de tratamento com o fármaco, mesmo com a dose inicial mais baixa de anticorpo biespecífico, tem-se observado uma súbita queda dos números de células T CD3+, CD4+ e CD8+ (ilustrados como percentagens do número total de linfócitos) no período de infusão de 4 h. Os números das células T recuperaram para aproximadamente os valores pré-dose em 24 a 48 h. Observou-se uma curva de progressão semelhante das contagens de células T, nos outros doentes envolvidos neste estudo. Uma explicação para esta queda é a súbita adesão e migração - pelo menos parcial -, para os tecidos, de células T activadas e outros leucócitos activados. Põe-se a hipótese de essa súbita activação e deslocação de populações enormes de células T activadas (aproximadamente 80% do conjunto de células T humanas residentes no sangue periférico, em qualquer momento) resulta num distúrbio da homeostase das células T assim como na disrupção dos perfis locais de citocina nos tecidos. Na verdade, a administração do fármaco a doentes, de acordo com o modo ilustrado na figura 1, leva a efeitos secundários adversos. Este resultado sugeriu que uma activação mais gradual e uma deslocação das populações de células T podem estar próximas de uma resposta imunitária fisiológica e pode evitar fenómenos tais como um súbito distúrbio das redes locais de citocina e efeitos secundários adversos deles resultantes.

Exemplo 4:

Ensaio clínico da fase I - doente 1003

Num outro ensaio clínico, o perfil de segurança da infusão intravenosa repetida do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2; ver também WO 99/54440), a dose máxima tolerada e a dose biológica óptima foram ensaiadas em doentes com linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) indolente ou agressivo, refractário ou leucemia de células B. Cada doente recebeu seis infusões anti-CD19 x anti-CD3, ao longo de duas ou quatro, nos dias 0, 2, 4, 14, 16 e 18 do estudo. Um total de 15 doentes foi tratado com doses até 3,0 µg/m².

Recolheram-se amostras de sangue, em diferentes momentos, antes e durante a administração do fármaco para seguir os parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos. O número de células T foi determinado como se segue. Além disso, utilizando um ensaio imuno-absorvente ligado a enzimas (ELISA) e uma matriz de pérolas citométricas (MPC), determinaram-se os níveis de citocinas no soro dos doentes.

Quando se monitoriza o número de células T em doentes tratados, encontraram-se flutuações robustas dos números das células T após infusão, sugerindo uma activação súbita de células T, conforme observado em estudos anteriores; ver o exemplo 3. Além disso, conforme se mostra nas figuras 2 a 5, para um doente (isto é, o doente 1003) com um diagnóstico de linfoma da células do manto (LCM), após infusão do anticorpo biespecífico, verificou-se uma forte

libertação co citocinas do FNT alfa, interferão gama, interleucina-6 e interleucina-10, nos doentes tratados. A intensidade de libertação de citocinas foi mais elevada após a administração da primeira dose, com um decréscimo da resposta a infusões subsequentes de anticorpo biespecífico anti-CD19x anti-CD3 (efeito da primeira dose). Após 6 infusões, não se observou praticamente nenhuma indução dos níveis de citocina. Tal como no estudo ilustrado no exemplo 3, a activação abrupta de células T e a libertação de citocinas levou a efeitos secundários adversos nos doentes. A maior parte destes eventos foram de gravidade média ou moderada e foram todos temporários. As anomalias laboratoriais mais frequentes verificaram-se em vários parâmetros hematológicos e de coagulação, que também foram temporários e a maior parte deles de uma natureza ligeira ou moderada no que respeita ao seu significado clínico. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que pode ser necessária uma activação mais gradual das células T par evitar fenómenos tais como um distúrbio súbito das redes locais de citocinas, observado nos ensaios clínicos descritos antes.

Exemplo 5:

1. Estudo para o tratamento por infusão contínua de doentes com linfoma não Hodgkin (LNH B) com um anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO. 2)

Para avaliar a segurança e a tolerância ao anticorpo biespecifico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (bscCD19xCD3; sequência de aminoácidos ilustrada na SEQ ID NO.2), administrou-se o composto por meio de infusão

contínua de longo prazo. Na secções 2 e 3 que se seguem, ilustram-se dois doentes com reincidência de linfoma não Hodgkin de células (LNH B) (doente #105003 e doente #102003). No primeiro dia de tratamento, tos dois doentes receberam uma "dose inicial de exposição" de $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ de anticorpo biespecífico anti-CD19 x anti-CD3 sob a forma de uma infusão intravenosa (i.v.) contínua. Depois, aumentou-se a dose para uma "dose de manutenção" de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24\text{h}$ que foi administrada sob a forma de uma infusão intravenosa contínua para o período remanescente da infusão de 2 semanas (para o doente #102003) ou de 4 semanas (para o doente #105003). Administrou-se a dose diária do fármaco em investigação numa solução isotónica de NaCl de 500 ml contendo ASH a 5 %. Cada um dos doentes recebeu uma co-terapêutica com um glicocorticosteróide (metil-prednisolona), numa concentração de $1 \times 100 \text{ mg}$ (i.v.), 1 h antes do início da infusão de anticorpo biespecífico, de modo a parar a libertação de citocinas na fase inicial do período de infusão. A secção 4 deste exemplo 5 dá ainda um resumo dos dados dos doentes tratados com uma "dose inicial de exposição" (entre $0,5$ e $5 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) e uma "dose de manutenção" de $15 \mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$).

2. Doente #105003 com um diagnóstico de linfoma folicular (linfoma não Hodgkin de células B)

Foi diagnosticado, no ano 2000, um linfoma folicular a este doente, um homem com 44 anos de idade. O doente tinha sido submetido anteriormente a várias quimioterapias (CHOP; Bendamustin) e imunoterapias (Rituximab; anticorpo monoclonal anti-CD20). Após uma participação durante 2 anos num ensaio de vacinação, a doença começou, uma vez mais, a progredir. No Outono de 2005, o doente experimentou uma

maior infiltração da medula óssea em resultado da anemia e infiltração do pulmão com prejuízo da função respiratória. Além disso, a qualidade de vida deste doente ficou claramente reduzida devido ao facto de a sintomatologia ter piorado (esplenomegália, aumento de suores nocturnos e perda de 3 kg em 3 semanas). Este estado clínico tornou necessária uma nova terapêutica.

A seguir, o doente tomou anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2) num nível de dose de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ h sob a forma de uma infusão contínua, durante 4 semanas, tal como se detalhou antes. O tratamento iniciou-se em 03.10.2005 e foi bem tolerado, isto é, não se observaram efeitos secundários adversos significativos.

2.1 Activação e proliferação de células T por meio de um anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3

Analisaram-se células mononucleares de sangue periférico obtido do doente #105003, em diferentes momentos, de acordo com o protocolo do estudo, por meio de fluxo-citometria com 4 cores, após coloração com a seguinte combinação de 4 anticorpos ou marcadores de superfície diferentes:

Painel 1: (células T) CD2 x CD3 x CD4 x CD8

Painel 2: (contagens de linfócitos: células B, T e AN) CD3 x CD16 x CD19 x CD56

Painel 3: (activação de células T CD8^+) CD8 x CD25 x CD69 x HLA-DR

Painel 4: (sub-conjuntos de células T CD8⁺) CD8 x CD28
x CD45RA x CCR7

As contagens absolutas de células, dos sub-conjuntos de linfócitos, isto é, células B, T e AN, definidas como células CD19⁺/CD3⁻, CD3⁺ e CD3⁻/CD56⁺, respectivamente, foram calculadas a partir do painel 2 como % (células B, T ou AN) / (% de células B + % de células T + % de células AN) multiplicada pelas contagens totais de linfócitos da respectiva amostra de sangue, conforme determinado por uma rotina de laboratório. As contagens absolutas das células T CD4⁺ e CD8⁺ foram calculadas a partir do painel 1 como % das células CD3⁺CD4⁺CD8⁻ / % das células CD3⁺ ou % das células CD3⁺CD4⁻CD8⁺ / % das células CD3⁺, respectivamente, multiplicada pela contagens absolutas das células T, conforme calculado no painel 2. As contagens absolutas dos sub-conjuntos de células T CD8⁺ foram calculadas a partir das proporções de percentagens obtidas do painel 4, cada uma delas multiplicada pelas contagens absolutas das células T, conforme calculado no painel 2:

% de células CD8⁺CD45RA⁺CD28⁺/% de células CD8⁺
(correspondendo a células T CD8⁺ naturais),

% de células CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁺/% de células CD8⁺
(correspondendo a células T CD8⁺ da memória central = T_{MC}),

% de células CD8⁺CD45RA⁻CCR7⁻/% de células CD8⁺
(correspondendo a células T CD8⁺ da memória efectora = T_{ME}),

% de células CD8⁺CD45RA⁺CD28⁺/% de células CD8⁺
(correspondendo a (células T citotóxicas) CTL diferenciadas

terminalmente = células T CD8⁺ da memória efectora positivas para CD45RA = T_{MERA}.

A activação das células T neste doente foi determinada como a % de células T CD8⁺ que expressam os marcadores de activação da superfície das células, CD25, CD69 ou HLA-DR (painel 3 da citometria de fluxo) de todas as células T CD8⁺.

Primeiro houve que analisar as contagens das células T CD4⁺ e CD8⁺. Como se mostra na figura 6, as células T CD8⁺ e CD4⁺ desapareceram em grande parte do sangue periférico após o início da infusão do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, que se explica como um fenómeno de distribuição provocado pela activação de células T através da reticulação das células T e B do sangue periférico, mediada pelo anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Contudo, após meia semana de tratamento, as células T CD8⁺ e CD4⁺ reaparecem no sangue e o seu número aumenta até aos 7^º e 21^º dias, respectivamente. Em comparação com os valores iniciais, as células T CD8⁺ e CD4⁺ mostraram um aumento no sangue de 3,5 a 4 vezes. As contagens das células T CD8⁺ e CD4⁺ permaneceram elevadas durante as 2 e 3 semanas de tratamento, antes do número de células T diminuir durante a quarta semana de tratamento. As contagens das células T CD8⁺ e CD4⁺ permaneceram ainda acima dos valores pré-tratamento correspondentes, passadas 4 semanas de infusão com o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, quando se diagnosticou uma diminuição substancial do tumor, preenchendo assim os critérios de resposta parcial, tal como se estabelecem a seguir.

Em seguida, analisaram-se com mais detalhe as sub-populações de células T CD8⁺. Como se mostra na figura 7, a análise das sub-populações das células T CD8⁺ revelou que o sub-conjunto da memória efectora TME foi quase exclusivamente responsável pela expansão das células T CD8⁺, induzida pelo anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. A contagem das células T CD8⁺, no que respeita à maior parte da actividade citotóxica, entre todas as células T e as células de TME, em conjunto com a maior parte da actividade citotóxica entre as células T CD8⁺. Excepto no que respeita ao sub-conjunto de TME, não se observaram alterações significativas nas contagens de células entre as outras sub-populações de células T CD8⁺, como as células T maduras que não são capazes de proliferar depois de um único sinal de activação, conforme providenciado pelo anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 ou o sub-conjunto de TMERA que não é mesmo capaz de proliferar. Assim, a expansão selectiva das células TME CD8⁺ concorrentes com a proliferação, pode ser claramente atribuída à divisão e à proliferação das células, em resposta ao contacto das células TME CD8⁺ com as células B de linfoma comportando o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 dentro do tumor; ver também a figura 14. Pode-se excluir uma contribuição significativa para a expansão das células T das células B de linfoma comportando o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 em circulação no sangue porque já se tinha feito a depleção das células B de linfoma em circulação no sangue periférico, no 3º dia, isto é, antes de se observar a expansão das células T.

Finalmente, analisou-se a activação das células T CD8⁺ pelo facto de os marcadores de activação das células T

terem sido seguidos como se mostra na figura 8. A expansão das células T CD8⁺ é precedida de uma forte activação das células T CD8⁺, conforme indicado por uma regulação sustentada do marcador de activação HLA-DR. Outros marcadores de activação como CD69 e CD25 apenas exibiram uma curta regulação temporária após o início da infusão da estrutura da presente invenção, o que se explica pela activação através das células B de linfoma comportando o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 em circulação no sangue, porque já se tinha feito a depleção das células B de linfoma em circulação, a partir do sangue periférico, nos primeiros 3 dias de tratamento. Ao contrário, a regulação sustentada de HLA-DR, ao longo de 3 semanas, reflecte a activação das células T CD8⁺ no tumor através do contacto com as células B de linfoma residentes no tumor que comportam o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. A activação intra-tumoral das células T resulta numa resposta proliferativa das células T dentro do tumor, o que leva à expansão das células T que, secundariamente, também aparecem no sangue em circulação. Estas células T activadas no tumor e que migram depois para o sangue ainda exibem o marcador de activação de longo prazo, HLA-DR, mas já desregularam os marcadores de activação de curto prazo CD69 e CD25.

Como conclusão, o tratamento com anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 causou activação e expansão das células T a longo prazo. As células T, com um fenótipo predominantemente citotóxico, têm em conta a expansão das células T CD8⁺. A activação e a proliferação das células T são induzidas no tumor por meio de células B de linfoma comportando o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. A

diminuição da activação das células T durante a terceira semana e a diminuição das contagens das células T durante a quarta semana de infusão, podem ser explicadas pela eficácia do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 neste doente, o que leva a uma diminuição do volume do tumor de 58,0 %, como se pode diagnosticar após 4 semanas de tratamento com o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (ver a seguir), reduzindo assim o número total de células B de linfoma, o que pode induzir a activação de células T e a proliferação de células T mediada pelo anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3.

2.2 Depleção de células B de sangue periférico (linfoma) por meio do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3

Analísaram-se as células mononucleares de amostras de sangue periférico obtidas do doente #105003 do estudo, em diferentes momentos, até à melhor resposta clínica, por meio de citometria de fluxo, de acordo com processos-padrão, após coloração com uma combinação de anticorpos contra os seguintes 4 marcadores das superfícies das células: CD3 (marcador de células T) x CD16 (marcador de células AN/macrófagos) x CD19 (marcador de células B) x CD56 (marcador de células AN). As contagens absolutas de células dos sub-conjuntos de linfócitos, isto é células B, T e AN, definidas como células $CD19^+/CD3^-$, $CD3^+$ e $CD3^-/CD56^+$, respectivamente, foram calculadas como $\%$ (células B, T ou AN) / ($\%$ de B + $\%$ de T + $\%$ de AN) multiplicada pela contagens totais de linfócitos da respectiva amostra de sangue, conforme determinado por uma rotina de laboratório.

Assim, os números absolutos das células B (linfomas) foram calculados como os números totais de células CD19⁺/CD3⁻.

Como se mostra na figura 9, o doente começou com cerca de 140 células B (linfoma) por ml de sangue, antes do tratamento. Após o início da infusão do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, a circulação de células B (linfoma) caiu rapidamente nos primeiros 3 dias de tratamento e finalmente desapareceu completamente do sangue periférico no fim da primeira semana de tratamento. Além disso, as células B (linfoma) permaneceram ausentes do sangue periférico até se diagnosticar a resposta parcial, após 4 semanas de tratamento; ver a seguir. Estes dados mostram que o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 pode eliminar completamente as células B (linfoma) da circulação devido à sua actividade citotóxica contra as referidas células.

2.3 Redução das dimensões dos linfomas por meio do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3

Para a avaliação da eficácia do tratamento por meio do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, utilizaram-se os critérios de resposta normalizados para a avaliação de respostas ao linfoma não Hodgkin (LNH). De acordo com estes critérios, tem de se seleccionar 6 lesões representativas de linfoma. A soma do produto dos diâmetros maiores da secção transversal das lesões de linfoma define-se como a linha de base da SPD (soma do produto dos diâmetros). Avalia-se então a variação desta SPD, numa base regular, durante todo o tratamento e no período de seguimento do estudo. Por exemplo, define-se uma

resposta parcial como uma diminuição ≥ 50 % na SPD. Como demonstrado na figura 10, no novo estadiamento, após 4 semanas de tratamento, verificou-se uma clara redução das massas do tumor de linfoma, de acordo com a avaliação da resposta para a LNH estabelecida anteriormente: diagnosticou-se uma diminuição na soma SPD de 6 lesões de linfoma de referência, de 58,0 %, correspondendo a uma resposta parcial (RP) na avaliação da resposta ao tumor feita por tomografia computadorizada (TC). 8 Semanas após o tratamento com o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 confirmou-se a resposta parcial por tomografia computadorizada, que mostrou uma diminuição do volume do tumor de 66 % (SPD).

3. Diagnosticou-se no doente #102003 linfoma linfocítico pequeno (LLC-B)

Foi diagnosticado, em Abril de 1999, um linfoma linfocítico pequeno a este doente, um homem com 60 anos de idade. Observações relevantes na história clínica deste doente foram síndrome da apneia do sono, insuficiência renal aguda, herpes zoster, bronquite intermitente e hepatopatia intermitente. O doente tinha uma história de várias quimioterapias (clorambucilo; fludarabina; knospe; endoxano), imunoterapias (rituximab; anticorpo monoclonal anti-CD20) e tratamento radiológico da região abdominal.

Na história da doença, de 7 anos, o doente recebeu 7 regimes diferentes de quimioterapia, assim como rituximab como mono-terapia ou terapia de combinação e radioterapia, sem demonstrar qualquer resposta importante. A administração do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 foi o 13º regime terapêutico para este

doente. O doente tomou anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 (SEQ ID NO.2) num nível de dose de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$, sob a forma de uma infusão contínua, durante 2 semanas, tal como se detalhou antes. O tratamento teve início em 09.05.2005. Após duas semanas de tratamento, fez-se uma reavaliação completa, cujos resultados se apresentam a seguir.

3.1 Depleção de células B de sangue periférico (linfoma) por meio do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3

Determinou-se as contagens das células B como se estabeleceu na secção 2.2, supra. Como se mostra na figura 11, o doente começou com 920 células B (linfoma) por ml de sangue, antes do tratamento. Depois de se iniciar a infusão do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, a circulação de células B (linfoma) no sangue mostrou um rápido decréscimo no seguimento de uma fase temporária de recuperação limitada a 600 células por ml, nos primeiros 3 dias, o que é consistente com a redistribuição das células. No seguimento do tratamento, as células B (linfoma) desapareceram completamente da circulação até se diagnosticar uma resposta parcial, passadas 2 semanas de tratamento. Estes dados confirmam que o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 é capaz de eliminar completamente as células B (linfoma) em circulação, como parte da sua eficácia clínica.

3.2 Eliminação do infiltrado do linfoma da medula óssea por meio do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3

Além disso, realizou-se a histopatologia da medula óssea antes e depois do tratamento com o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Como se mostra na figura 12, no painel da esquerda, antes do tratamento, podia-se observar uma infiltração de 40-50 % da medula óssea por linfoma linfocítico de células pequenas. Confirmou-se o diagnóstico de linfoma linfocítico de células pequenas/LLC. Tal como descrito na figura 12, no painel da direita, após o tratamento com o anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3, já não houve evidência de infiltração por células pequenas de linfoma linfocítico, enquanto se podia observar um aumento significativo das células T. Estes dados demonstram a eliminação de células de linfoma da medula óssea, abaixo do limite de detecção do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Esta observação é consistente com uma resposta completa da medula óssea que é difícil de conseguir, por exemplo, pela quimioterapia convencional.

3.3 Redução das dimensões do linfoma por meio do anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3

Além disso, numa reavaliação, após 2 semanas de tratamento, verificou-se uma clara redução das massas tumorais de linfoma: como se mostra na figura 13, diagnosticou-se uma diminuição de 57,2 % da dimensão das seis lesões de referência de linfoma, por tomografia computadorizada (TC), correspondendo a uma resposta parcial (RP), na avaliação da resposta do tumor. Nos 7 anos de história da doença, durante os quais o doente foi submetido a 7 regimes diferentes de quimioterapia, assim como de imunoterapia e radioterapia, sem demonstrar nenhuma resposta significativa, o tratamento deste doente com uma

estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19 x anti-CD3, pela primeira vez, providenciou uma terapêutica com sucesso que conseguiu mais do que 50 % de diminuição das lesões de referência do linfoma.

4. Resumo dos dados clínicos

Os doentes que tiveram uma recaída do LNH indolente foram incluídos, de acordo com uma concepção clássica de um escalonamento da dose de 3 + 3, com doses iniciais de 0,5 µg/m²/24 h. Foi dada uma cobertura inicial de esteróides para mitigar os sintomas assumidos de libertação de citocina. Avaliou-se a segurança e a tolerância por CTC-AE (os critérios de terminologia comum para eventos adversos). Os critérios de terminologia comum para eventos adversos do NCI (National Cancer Institute) são uma terminologia descritiva que pode ser utilizada para relatar eventos adversos (EA). Dá-se uma escala de graduação (gravidade) para cada critério do termo do EA e o escalonamento da dose só é permitido depois de uma comissão de revisão ter concluído sobre a segurança da dose anterior com um período de TLD (toxicidade limitativa da dose) de 14 dias. Monitorizou-se a actividade biológica investigando os níveis de citocinas sistémicas utilizando ensaios específicos por ELISA e por quantificação e caracterização dos sub-conjuntos de células imunitárias periféricas por via de uma análise de SCAF. Passadas 4 semanas de tratamento com anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 realizou-se um rastreio de controlo por TC (tomografia computadorizada). Se os doentes ficaram pelo menos estáveis, de acordo com os critérios normalizados de Cheson (revistos por causa da radiologia central), ofereceu-se aos doentes mais um ciclo de 4 semanas de

anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3. Os critérios de Cheson foram desenvolvidos pelo National Cancer Institute e a indústria farmacêutica internacional para providenciar uma orientação para avaliar a resposta clínica na LNH. De acordo com os critérios, obtém-se uma resposta completa quando há um desaparecimento completo de todas as evidências detectáveis clínica e radiograficamente da doença e de sintomas relacionados com a doença, todos os nódulos linfáticos voltaram à dimensão normal, o baço tinha regressado à sua dimensão e a medula óssea estava claramente livre de linfoma. Para uma resposta parcial, deve haver uma diminuição da dimensão de 50 % dos seis maiores nódulos linfáticos dominantes, sem aumento na dimensão dos outros nódulos, fígado ou baço, os nódulos esplénicos e hepáticos devem regredir de pelo menos 50 % e não deve haver novos sítios com doença.

Até agora incluíram-se 19 doentes com um número médio de 4 terapêuticas prévias de quimioterapia/imunoterapia. Durante o escalonamento da dose a partir do ND1 (0,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) (ND = nível da dose) até ND3 (5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$) não se observou toxicidade por limitação da dose e os EA (eventos adversos) foram geralmente moderados. Com o ND4 (5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ no primeiro dia, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24 \text{ h}$ como dose de manutenção), trataram-se 7 doentes com 2 doentes a receber menos de 14 dias de tratamento (1 NDT, 1 interrupção por decisão do investigador). Observou-se uma eliminação completa das células B (linfoma) em circulação no fim da infusão de anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3 em 9 dos 14 doentes avaliáveis (tratamento > 2 semanas e células B detectáveis no sangue periférico antes da infusão de anticorpo biespecífico de cadeia única anti-CD19 x anti-CD3). Um aumento da frequência, dependente da

dose, atingiu 100 % para o ND4. Para o ND4, 3 dos 7 tiveram uma infiltração relevante da medula óssea (MO) (> 10 %) com um doente a mostrar uma melhoria e 2 doentes a mostrar o desaparecimento completo das células de linfoma na MO. A melhor resposta global ao tumor nos 14 doentes avaliados (tratamento > 2 semanas e rastreio de todas as áreas envolvidas) foi 1 RC (resposta completa no doente # 109002, um homem com 61 anos de idade com um diagnóstico de linfoma folicular, grau 1, estágio IIIa), 2 RP (resposta parcial), 1 RM (resposta menor), 7 DE (doença estável) e 3 DP (doença progressiva). Em particular, o doente #109002 mostrou ainda resultados impressionantes, nomeadamente uma remissão completa (RC); ver figuras 14 a 16. Esta remissão completa foi conseguida no referido doente com uma dose inicial de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ h no primeiro dia de tratamento e uma dose subsequente de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ h, durante 4 semanas. Passadas estas 4 semanas, o doente # 109002 exibiu uma resposta parcial e o doente recebeu de imediato mais uma dose de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^2/24$ h, durante mais 4 semanas, levando a uma resposta completa.

Sem estar limitado ao que se segue, a técnica define "resposta completa", "resposta parcial", "doença em progressão" e "resposta menor" como se segue:

Declara-se muitas vezes uma resposta completa se as lesões não são detectadas por imagiologia por TC e outros exames. Se a imagiologia por TC e o exame da medula óssea não evidenciam a doença, define-se mais rigorosamente como uma resposta completa.

A resposta parcial descreve uma resposta à terapêutica em que se mede pelo menos 50 % de redução da carga tumoral mensurável.

Considera-se que um doente tem a doença em progressão quando experimenta sintomas (febre, suores nocturnos, etc.) e quando os nódulos linfáticos aumentam de dimensão ou se observam novos nódulos linfáticos aumentados.

Considera-se que um doente tem a doença estável ou em regressão quando não tem sintomas e quando os nódulos linfáticos não crescem ou se observa regressão da sua dimensão. Algumas vezes este estado clínico ou a inactividade clinicamente observada da doença é descrito como uma remissão.

Uma "resposta menor" significa, grosseiramente, uma pequena diminuição do volume. Resposta menor não é um termo-padrão, mas utiliza-se cada vez mais. Falando de forma mais vulgar, uma resposta menor é mais do que 25 % do volume total do tumor, mas menos do que 50 %. O que a tornaria numa resposta parcial.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Micromet AG

<120> Tratamento de doenças tumorais

<130> L1410 PCT S3

<160> 45

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1
 <211> 1587
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> scFv biespecifico de CD 19 x CD3

<400> 1

```

gaattccacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt      60
ccactccgat atccagctga cccagtctcc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag      120
ggccaccatc tcctgcaagg ccagccaaag tgttgattat gatggtgata gttatttgaa      180
ctggtaccaa cagattccag gacagccacc caaactcttc atctatgatg catccaatct      240
agtttctggg atcccacca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcacctcaa      300
catccatcct gtggagaagg tggatgctgc aacctatcac tgtcagcaaa gtactgagga      360
tcctgtggacg ttcggtggag ggaccaagct cgagatcaaa ggtggtggtg gttctggcgg      420
cggcggtctc ggtggtggtg gttctcaggt gcagctgcag cagtctgggg ctgagctggt      480
gaggcctggg tcctcagtga agatttcttg caaggcttct ggctatgcat tcagtagcta      540
ctggatgaac tgggtgaagc agaggcctgg acagggtctt gagtggattg gacagatttg      600
gcctggagat ggtgatacta actacaatgg aaagttcaag ggtaaagcca ctctgactgc      660
agacgaatcc tccagcacag cctacatgca actcagcagc ctagcatctg aggactctgc      720
ggtctatttc tgtgcaagac gggagactac gacggtaggc cgttattact atgctatgga      780
ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctccctccga ggtggtggat ccgatatcaa      840
actgcagcag tcaggggctg aactggcaag acctggggcc tcagtgaaga tgtcctgcaa      900
gacttctggc tacaccttta ctaggtacac gatgcactgg gtaaaacaga ggcttgga      960
gggtctggaa tggattggat acattaatcc tagccgtggt tatactaatt acaatcagaa     1020
gttcaaggac aaggccacat tgactacaga caaatcctcc agcacagcct acatgcaact     1080
gagcagcctg acatctgagg actctgcagt ctattactgt gcaagatatt atgatgatca     1140
ttactgcctt gactactggg gccaaaggac cactctcaca gtctcctcag tcgaagggtg     1200

```

aagtggaggt tctgggtggaa gtggaggttc aggtggagtc gacgacattc agctgaccca	1260
gtctccagca atcatgtctg catctccagg ggagaaggtc accatgacct gcagagccag	1320
ttcaagtgtg agttacatga actggtacca gcagaagtca ggcacctccc ccaaaagatg	1380
gatttatgac acatccaaag tggcttctgg agtcccttat cgcttcagtg gcagtgggtc	1440
tgggacctca tactctctca caatcagcag catggaggct gaagatgctg ccacttatta	1500
ctgccaaacag tggagtagta acccgctcac gttegggtgct gggaccaagc tggagctgaa	1560
acatcatcac catcatcatt agtcgac	1587

<210> 2

<211> 523

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> scFv biespecifico de CD 19 x CD3

<400> 2

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly	1	5	10	15
Val	His	Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	20	25	30	
Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	35	40	45	
Asp	Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	50	55	60	
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	65	70	75	80
Ile	Pro	Pro	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	85	90	95	
Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	His	Cys	Gln	100	105	110	
Gln	Ser	Thr	Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	115	120	125	
Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	130	135	140	

Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 145 150 155 160

Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
 165 170 175

Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 180 185 190

Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 195 200 205

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 210 215 220

Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 225 230 235 240

Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
 245 250 255

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 260 265 270

Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 275 280 285

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 290 295 300

Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 305 310 315 320

Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln
 325 330 335

Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 340 345 350

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 355 360 365

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly
 370 375 380

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr
 405 410 415

Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met
 420 425 430

Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln
 435 440 445

Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val
 450 455 460

Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser
 465 470 475 480

Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
 485 490 495

Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
 500 505 510

Lys Leu Glu Leu Lys His His His His His His
 515 520

<210> 3

<211> 1533

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CD 19 VP/VL x CD3 VP/VL (BsrG I a Sal I)

<400> 3

tgtacactcc caggtgcagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggtcctc	60
agtgaagatt tcctgcaagg cttctggcta tgcattcagt agctactgga tgaactgggt	120
gaagcagagg cctggacagg gtcttgagtg gattggacag atttggcctg gagatgggtga	180
tactaactac aatggaaagt tcaagggtaa agccactctg actgcagacg aatcctccag	240
cacagcctac atgcaactca gcagcctagc atctgaggac tctgcgggtct atttctgtgc	300
aagacgggag actacgacgg taggccgtta ttactatgct atggactact ggggccaagg	360
gaccacggtc accgtctcct cgggtggtgg tggttctggc ggcggcggct cgggtggtgg	420
tggttctgat atccagctga cccagctctc agcttctttg gctgtgtctc tagggcagag	480
ggccaccatc tcctgcaagg ccagccaaag tgttgattat gatggtgata gttatttgaa	540
ctggtacca aagattccag gacagccacc caaactcctc atctatgatg catccaatct	600
agtttctggg atcccaccca ggtttagtgg cagtgggtct gggacagact tcaccctcaa	660
catccatcct gtggagaagg tggatgctgc aacctatcac tgtcagcaaa gtactgagga	720
tccgtggacg ttcggtggag ggaccaagct cgagatcaaa tccggagggtg gtggatccga	780
tatcaaactg cagcagtcag gggctgaact ggcaagacct ggggcctcag tgaagatgtc	840
ctgcaagact tctggctaca cttttactag gtacacgatg cactgggttaa aacagaggcc	900
tggacagggc ctggaatgga ttggatacat taatcctagc cgtgggtata ctaattacaa	960
tcagaagttc aaggacaagg ccacattgac tacagacaaa tcctccagca cagcctacat	1020
gcaactgagc agcctgacat ctgaggactc tgcagctctat tactgtgcaa gatattatga	1080
tgatcattac tgccttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagtcga	1140
agggtgaagt ggaggttctg gtggaagtgg aggttcaggt ggagtcgacg acattcagct	1200
gaccagtcct ccagcaatca tgtctgcac tccaggggag aaggtcacca tgacctgcag	1260
agccagttca agtgtaagtt acatgaactg gtaccagcag aagtcaggca cctcccccaa	1320
aagatggatt tatgacacat ccaaagtggc ttctggagtc ccttatcgct tcagtggcag	1380
tgggtctggg acctcact ctctcacaat cagcagcatg gaggetgaag atgctgccac	1440
ttattactgc caacagtgga gtagtaacce gtcacgttc ggtgctggga ccaagctgga	1500
gctgaaâcat catcaccatc atcattagtc gac	1533

<210> 4

<211> 505

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CD 19 VP/VL x CD3 VP/VL (proteína madura w/o
líder)

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr
130 135 140

Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
145 150 155 160

Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu
165 170 175

Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
180 185 190

Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser
195 200 205

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val
210 215 220

Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr
225 230 235 240

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser
245 250 255

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
260 265 270

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
275 280 285

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 290 295 300
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 305 310 315 320
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 325 330 335
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 340 345 350
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 355 360 365
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 370 375 380
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser
 385 390 395 400
 Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
 405 410 415
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 420 425 430
 Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser
 435 440 445
 Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 450 455 460
 Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 465 470 475 480
 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 485 490 495
 Glu Leu Lys His His His His His His
 500 505

<210> 5

<211> 1531

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 VP/VL x CD19 VP/VL (BsrG I a Sal I)

<400> 5

```
tgtacactcc gatatcaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc      60
agtgaagatg tcttgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt      120
aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta      180
tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag      240
cacagcctac atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc      300
aagatattat gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt      360
ctcctcaggt ggtgggtggt ctggcggcgg cggctccggt ggtgggtggt ctgacattca      420
gctgaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggcca ccatgacctg      480
cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctggtaccag cagaagtcag gcacctcccc      540
caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtcccttacc gcttcagtgg      600
cagtgggtct gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgctgc      660
cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg ttgggtgctg ggaccaagct      720
ggagctgaaa tccggaggtg gtggatccca ggtgcagctg cagcagctctg gggctgagct      780
ggtgaggcct gggtcctcag tgaagatttc ctgcaaggct tctggctatg cattcagtag      840
ctactggatg aactgggtga agcagaggcc tggacagggt cttgagtgga ttggacagat      900
ttggcctgga gatggtgata ctaactacaa tggaaagttc aagggtaaag ccactctgac      960
tgcagacgaa tctccagca cagcctacat gcaactcagc agcctagcat ctgaggactc     1020
tgcggctctat ttctgtgcaa gacgggagac tacgacggta ggccgttatt actatgctat     1080
ggactactgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctctctc ggtgggtggtg gttctggcgg     1140
cggcggctcc ggtgggtggtg gttctgatat ccagctgacc cagtctccag cttctttggc     1200
tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatctc ctgcaaggcc agccaaagtg ttgattatga     1260
tggtgatagt tatTTgaact ggtaccaaca gattccagga cagccacca aactcctcat     1320
ctatgatgca tccaatctag ttctgggat cccaccagg tttagtgga gtggtgtctg      1380
gacagacttc accctcaaca tccatctgt ggagaagggt gatgctgcaa cctatcactg      1440
tcagcaaagt actgaggatc cgtggacggt cggtgagggt accaagctcg agatcaaac      1500
cgggcatcat caccatcatc attgagtcga c                                1531
```

<210> 6

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 VP/VL x CD19 VP/VL

<400> 6

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 165 170 175
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
 180 185 190
 Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 195 200 205

Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp
210						215						220			
Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys
225					230					235					240
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu
				245					250					255	
Leu	Val	Arg	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly
			260					265					270		
Tyr	Ala	Phe	Ser	Ser	Tyr	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly
		275					280					285			
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Gln	Ile	Trp	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr
	290					295					300				
Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Glu
305					310					315					320
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Asp
				325					330					335	
Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Arg	Glu	Thr	Thr	Thr	Val	Gly	Arg
			340					345					350		
Tyr	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
		355					360						365		
Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	370					375					380				
Ser	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu
385					390					395					400
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr
				405					410					415	
Asp	Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro
			420					425					430		
Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro
		435					440					445	103		

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 210 215 220
 Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 225 230 235 240
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
 245 250 255
 Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 260 265 270
 Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 275 280 285
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr
 290 295 300
 Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp
 325 330 335
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg
 340 345 350
 Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 355 360 365
 Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380
 Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 385 390 395 400
 Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr
 405 410 415
 Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro
 420 425 430
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro
 435 440 445

Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile
 450 455 460

His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser
 465 470 475 480

Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 485 490 495

Ser Gly His His His His His His
 500

<210> 7

<211> 1528

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 VP/VL x CD19 VP/VL (BsrG I a Sal I)

<400> 7

tgtacactcc gatatacaaac tgcagcagtc aggggctgaa ctggcaagac ctggggcctc	60
agtgaagatg tcttgcaaga cttctggcta cacctttact aggtacacga tgcactgggt	120
aaaacagagg cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gccgtgggta	180
tactaattac aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actacagaca aatcctccag	240
cacagcctac atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc	300
aagatattat gatgatcatt actgccttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt	360
ctcctcaggt ggtgggtggt ctggcggcgg cggctccggt ggtgggtggt ctgacattca	420
gctgaccag tctccagcaa tcatgtctgc atctccaggg gagaaggcca ccatgacctg	480
cagagccagt tcaagtgtaa gttacatgaa ctgggtaccag cagaagtcag gcacctcccc	540
caaaagatgg atttatgaca catccaaagt ggcttctgga gtcccttata gcttcagtgg	600
cagtgggtct gggacctcat actctctcac aatcagcagc atggaggctg aagatgctgc	660
cacttattac tgccaacagt ggagtagtaa cccgctcacg ttcggtgctg ggaccaagct	720
ggagctgaaa tcgggagggt gtggatccga tatccagctg acccagtcct cagcttcttt	780
ggctgtgtct ctagggcaga gggccaccat ctcttgaag gccagccaaa gtgttgatta	840
tgatggtgat agttatttga actggtacca acagattcca ggacagccac ccaaactcct	900
catctatgat gcatccaatc tagtttctgg gatccacccc aggttttagtg gcagtgggtc	960
tgggacagac ttcaccctca acatccatcc tgtggagaag gtggatgctg caacctatca	1020
ctgtcagcaa agtactgagg atccgtggac gttcgggtgga gggaccaagc tcgagatcaa	1080
aggtgggtgt ggttctggcg gcggcggctc cgggtgggtgt ggttctcagg tgcagctgca	1140
gcagtctggg gctgagctgg tgaggcctgg gtccctcagt aagatttcct gcaaggcttc	1200
tggctatgca ttcagtagct actggatgaa ctgggtgaag cagaggcctg gacagggctc	1260
tgagtggatt ggacagattt ggccctggaga tggtgatact aactacaatg gaaagttcaa	1320
gggtaaagcc actctgactg cagacgaatc ctccagcaca gcctacatgc aactcagcag	1380
cctagcatct gaggactctg cggctctatt ctgtgcaaga cgggagacta cgacggtagg	1440
ccgttattac tatgctatgg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctccgg	1500
gcatcatcac catcatcatt gactcgac	1528

<210> 8

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 VP/VL x CD19 VP/VL (proteína madura w/o líder)

<400> 8

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 130 135 140

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
 145 150 155 160

Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 165 170 175

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro
 180 185 190

Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 195 200 205

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 210 215 220

Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser
 245 250 255

Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 260 265 270

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 275 280 285

Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
 290 295 300

Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 305 310 315 320

Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
 325 330 335

His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 340 345 350

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
 370 375 380

Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
 385 390 395 400

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly
 405 410 415

Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 420 425 430

Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser
 435 440 445

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala
 450 455 460

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr
 465 470 475 480

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 485 490 495

Gly His His His His His His
 500

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 RDC-P1

<400> 9

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His
 1 5 10

<210> 10

<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CD3 RDC-P2

<400> 10

Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Arg	Gly	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Asp

<210> 11
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CD3 RDC-P3

<400> 11

Tyr	Tyr	Asp	Asp	His	Tyr	Cys	Leu	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CD3 RDC-L1

<400> 12

Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn
1				5					10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 RDC-L2

<400> 13

Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser
1				5		

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> CD3 RDC-L3

<400> 14

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr
1				5				

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-CD19 VP

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-CD19 VL

<400> 16

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Tyr	Asp
			20					25					30		
Gly	Asp	Ser	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
	35						40					45			
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Ile	Pro	Pro
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Asn	Ile	His
65					70					75					80
Pro	Val	Glu	Lys	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	His	Cys	Gln	Gln	Ser	Thr
				85					90					95	
Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 17

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-CD3 VP

<400> 17

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> anti-CD3 VL

<400> 18

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Thr	Ser	Lys	Val	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Tyr	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Ala	Glu
65					70					75					80
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys						
			100					105							

<210> 19

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'L1

<400> 19

gaagcacgcg tagatatact gmtsacccaa wctcca 36

<210> 20

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'K

<400> 20

gaagatggat ccagcggcgg cagcatcagc 30

<210> 21

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'H1

<400> 21

cagccggcca tggcgcaggt scagctgcag sag 33

<210> 22

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'G

<400> 22

accaggggcc agtggataga caagcttggg tgcgtttt 39

<210> 23

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VLB5RRV

<400> 23

agggtgtacac tectgatatac cagctgaccc agtctcca 38

<210> 24

<211> 48

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VLGS15

<400> 24

ggagccgcgcg ccgccagaac caccaccttt gatctcgagc ttggtccc 48

<210> 25

<211> 53

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VHGS15

<400> 25

ggcggcgggcg gctccgggtgg tggtaggtct caggtsmarc tgcagsagtc wgg 53

<210> 26

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VHBspE1

<400> 26
aatccggagg agacggtgac cgtgggtccct tggccccag 39

<210> 27
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 5'VLL2KBspEIGS

<400> 27
cttccggagg tgggtggatcc gacattcagc tgacccag 38

<210> 28
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 3'VHL2KBspEI (terminal C)

<400> 28
cctccggagg agactgtgag agtgg 25

<210> 29
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 5'VHCD19BspEIGS

<400> 29
cttcggagg tggatgatcc caggtgcagc tgcagcag 38

<210> 30
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 3'VLCD19BspEI (terminal C)

<400> 30
cctccggatt tgatctcgag cttgg 25

<210> 31
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 5'VLCD19BspEIGS

<400> 31
cttcggagg tggatgatcc gatatccagc tgacc 35

<210> 32
<211> 31
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador 5'VPL2KBsrGI

<400> 32

aggtgtacac tccgatatca aactgcagca g 31

<210> 33

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VPL2KGS15

<400> 33

ggagccgcgcg ccgccagaac caccaccacc tgaggagaact gtgagagtgg 50

<210> 34

<211> 53

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VLL2KGS15

<400> 34

ggcgccggcg gctccggtgg tggcggttct gacattcagc tgaccacgctc tcc 53

<210> 35

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VLL2KBspEI

<400> 35

aatccggatt tcagctccag cttgg 25

<210> 36

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VHCD193srGI

<400> 36

agggtgtacac tcccaggtgc agctgcagca g 31

<210> 37

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VPCD19GS15

<400> 37

ggagccgcgc ccgccagaac caccaccacc ggaggagacg gtgaccgtgg 50

<210> 38

<211> 53

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VLCD19GS15

<400> 38

ggcggcgcg gctccggtgg tgggggttct gatatccagc tgacccagtc tcc 53

<210> 39

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VLCD19BspEI

<400> 39

aatccggatt tgatctcgag cttgg 25

<210> 40

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VLL2KBSrGI

<400> 40

aggtgtacac tccgacattc agctgaccca gtctc 35

<210> 41

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VLL2KGS15

<400> 41

ggagccgcgcg ccgcacagaac caccaccacc ttccagctcc agcttggtcc 50

<210> 42

<211> 53

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 5'VPL2KGS15

<400> 42

ggcgccggcg gctccggtgg tggcggttct gatatcaaac tgcagcagtc agg 53

<210> 43

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VHL2KBspEI

<400> 43

aatccggatg aggagactgt gagagtgggtg 30

<210> 44

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador 3'VPCD19BspEI (terminal C)

<400> 44

cctccggagg agacggtgac cgtgg 25

<210> 45

<211> 73

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador poli-ligante CTI

<400> 45

tctagaattc ttctgaatccg gaggtggtgg atccgatato cccgggcato atcaccatca 60

tcattgagtc gac 873

Lisboa, 2 de Março de 2015.

REIVINDICAÇÕES

1. Estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única caracterizada pelo facto de se utilizar num processo para a prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B) indolente ou agressiva ou leucemia de células B, em que o processo compreende a administração da referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única a um indivíduo que dela necessite, em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única contém domínios de ligação específicos para CD3 e CD19 humano, em que as correspondentes regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) e as correspondentes regiões variáveis de cadeia leve (V_L) estão arrançadas, do terminal N para o terminal C, na seguinte ordem

$V_L(CD19)-V_P(CD19)-V_P(CD3)-V_L(CD3),$
 $V_P(CD19)-V_L(CD19)-V_P(CD3)-V_L(CD3),$
 $V_P(CD3)-V_L(CD3)-V_P(CD19)-V_L(CD19)$ ou
 $V_P(CD3)-V_L(CD3)-V_L(CD19)-V_P(CD19),$

em que a estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única é administrada durante pelo menos 1 semana e numa dose diária de 10 μ g a 80 μ g por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a dose diária deverá ser administrada ao longo de pelo menos 6 h.

2. Utilização de uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B, indolente ou agressivo (HNL B) ou leucemia de células B, caracterizada pelo facto de a referida estrutura de

anticorpo biespecífico de cadeia única conter domínios de ligação específicos para CD3 humano e CD19 humano, em que as correspondentes regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) e as correspondentes regiões variáveis de cadeia leve (V_L) estão arranjadas, do terminal N para o terminal C, na seguinte ordem

$V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
 $V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
 $V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ ou
 $V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})$

e em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única será administrada durante pelo menos 1 semana, numa dose diária de 10 μg a 80 μg por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a dose diária deverá ser administrada ao longo de pelo menos 6 h.

3. Estojo para ser utilizado na prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B, indolente ou agressivo (HNL B) ou leucemia de células B, em seres humanos, de acordo com um regime de pelo menos uma semana, caracterizado por compreender a administração de uma estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única contendo domínios de ligação específicos para CD3 humano e CD19 humano, em que as correspondentes regiões variáveis de cadeia pesada (V_P) e as correspondentes regiões variáveis de cadeia leve (V_L) estão arranjadas, do terminal N para o terminal C, na seguinte ordem

$V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
 $V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})-V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})$,
 $V_P(\text{CD3})-V_L(\text{CD3})-V_P(\text{CD19})-V_L(\text{CD19})$ ou

$$V_F(CD3) - V_L(CD3) - V_L(CD19) - V_F(CD19)$$

e em que a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única será administrada durante pelo menos 1 semana, numa dose diária de 10 µg a 80 µg por metro quadrado da superfície corporal do doente e em que a referida dose diária deverá ser administrada ao longo de pelo menos 6 h e em que o referido estojo contém os seguintes componentes:

- (a) pelo menos 7 doses diárias individuais entre 140 µg e 320 µg da referida estrutura farmacêutica de anticorpo biespecífico de cadeia única; e
- (b) um meio para arranjar as componentes de modo a facilitar a adaptação e a tolerância do doente ao regime.

4. Estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou estojo de acordo com a reivindicação 3, caracterizados pelo facto de a dose diária ser administrada ao longo de pelo menos 10 h.
5. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou 4, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou 4 ou estojo de acordo com a reivindicação 3 ou 4, caracterizados pelo facto de a dose diária ser administrada ao longo de pelo menos 12 h.
6. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1, 4 ou 5, utilização de acordo com a reivindicação 2, 4 ou 5 ou estojo para ser

utilizado de acordo com as reivindicações 3-5, caracterizados pelo facto de a dose diária ser administrada ao longo de pelo menos 24 h.

7. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-6, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou qualquer uma das reivindicações 4-6 ou estojo para ser utilizado de acordo com uma qualquer das reivindicações 3-6, caracterizados pelo facto de a referida região VP do referido domínio específico de CD3 compreender pelo menos uma região RDC3 que contém a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 11.
8. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-7, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou qualquer uma das reivindicações 4-7 ou estojo para ser utilizado de acordo com uma qualquer das reivindicações 3-7, caracterizados pelo facto de a referida região VP do referido domínio específico de CD3 compreender pelo menos uma região RDC2 que contém a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 10.
9. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-8, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-8 ou estojo para ser utilizado de acordo com uma qualquer das reivindicações 3-8, caracterizados pelo facto de a referida região VP do referido domínio específico de CD3 compreender pelo menos uma região RDC1 que contém a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 9.

10. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-9, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-9 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-9, caracterizados pelo facto de a referida região VL do referido domínio específico de CD3 compreender pelo menos uma região RDC3 que contém a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 14.
11. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou qualquer uma das reivindicações 4-10, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-10 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-10, caracterizados pelo facto de a referida região VL do referido domínio específico de CD3 compreender pelo menos uma região RDC2 que contém a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 13.
12. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-11, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-11 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-11, caracterizados pelo facto de a referida região VL do referido domínio específico de CD3 compreender pelo menos uma região RDC1 que contém a sequência de aminoácidos: SEQ ID NO. 12.
13. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou qualquer uma das

reivindicações 4-12, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-12 ou estajo para ser utilizado de acordo com qualquer das reivindicações 3-12, caracterizados pelo facto de a referida região VP do referido domínio específico de CD3 compreender a SEQ ID NO. 17, a referida região VP do referido domínio específico de CD 19 compreender a SEQ ID NO. 15, a referida região VL do referido domínio específico de CD3 compreender a SEQ ID NO. 18 e/ou a referida região VL do referido domínio específico de CD19 compreender a SEQ ID NO. 16.

14. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com uma qualquer das reivindicações 4-13, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com uma qualquer das reivindicações 4-13 ou estajo para ser utilizado de acordo com uma qualquer das reivindicações 3-13, caracterizados pelo facto de a referida estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única compreender uma sequência de aminoácidos seleccionada no grupo que consiste em

- (a) uma sequência de aminoácidos conforme descrita nas SEQ ID NOS 2, 4, 6 ou 8;
- (b) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos conforme se ilustra nas SEQ ID NOS 1, 3, 5 ou 7;
- (c) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos com pelo menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 % ou 99 % de identidade com a sequência de ácidos nucleicos de (b), em que a referida sequência de aminoácidos é capaz de se ligar especificamente a CD3 e a CD 19; e

(d) uma sequência de aminoácidos codificada por uma sequência de ácidos nucleicos que está degenerada em resultado do código genético numa sequência de nucleótidos de (b), em que a referida sequência de aminoácidos é capaz de se ligar especificamente a CD3 e a CD 19.

15. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-14, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-14 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-14, caracterizados pelo facto de os referidos domínios variáveis estarem ligados por sequências ligantes adicionais.
16. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-15, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-15 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-15, caracterizados pelo facto de a administração diária ser contínua, durante pelo menos 2 semanas, pelo menos 3 semanas ou pelo menos 4 semanas.
17. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-16, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-16 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer uma das reivindicações 3-16, caracterizados pelo facto de a composição farmacêutica ser administrada em

combinação com um ou mais de outros agentes farmacêuticos.

18. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-17, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-17 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer das reivindicações 3-17, caracterizados pelo facto de a composição farmacêutica ser administrada a um doente humano.

19. Estrutura de anticorpo biespecífico para ser utilizada de acordo com a reivindicação 1 ou com qualquer uma das reivindicações 4-18, utilização de acordo com a reivindicação 2 ou com qualquer uma das reivindicações 4-18 ou estojo para ser utilizado de acordo com qualquer das reivindicações 3-18, caracterizados pelo facto de a estrutura de anticorpo biespecífico de cadeia única se destinar a ser administrada, no primeiro dia, numa dose inicial inferior a 10 µg a 80 µg por metro quadrado de superfície corporal do doente.

Lisboa, 2 de Março de 2015.

RESUMO

MEIOS E PROCESSOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS TUMORAIS

A presente invenção tem por objecto meios e processos farmacêuticos para a prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo e leucemia de células B, compreendendo a administração de uma estrutura de anticorpo de cadeia simples, biespecífico, a um indivíduo que disso tenha necessidade e utilização da referida estrutura de anticorpo de cadeia simples, biespecífico para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção, tratamento ou melhoria de linfoma não Hodgkin de células B (LNH B), indolente ou agressivo e leucemia de células B, em que a referida estrutura deve ser administrada durante pelo menos 1 semana, em doses diárias específicas. Além disso, a presente invenção tem por objecto estojos que contêm uma estrutura de anticorpo de cadeia simples, biespecífico para ser utilizado de acordo com a presente invenção.

Figura 1

Doente 0202

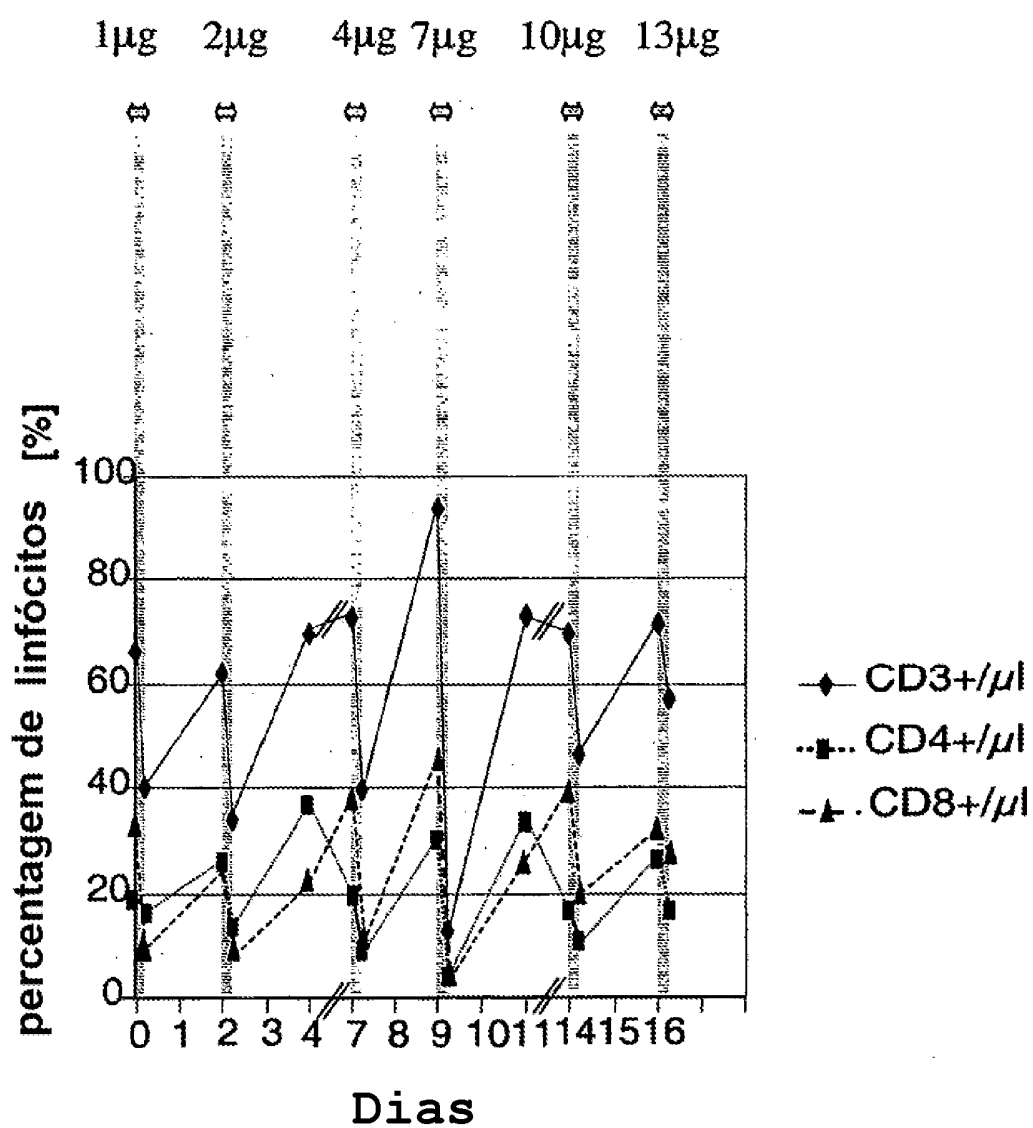


Figura 2

Doente 1003/FNT alfa

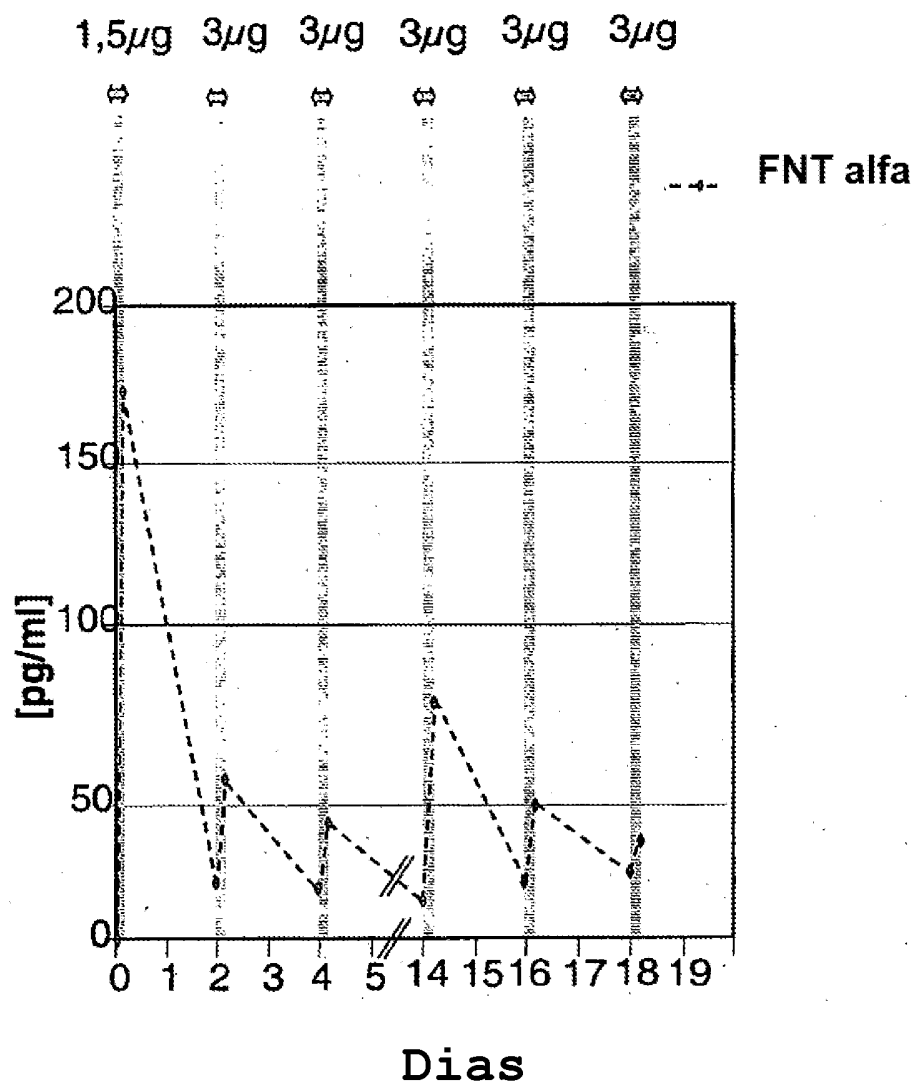


Figura 3

Doente 1003/IFN gama

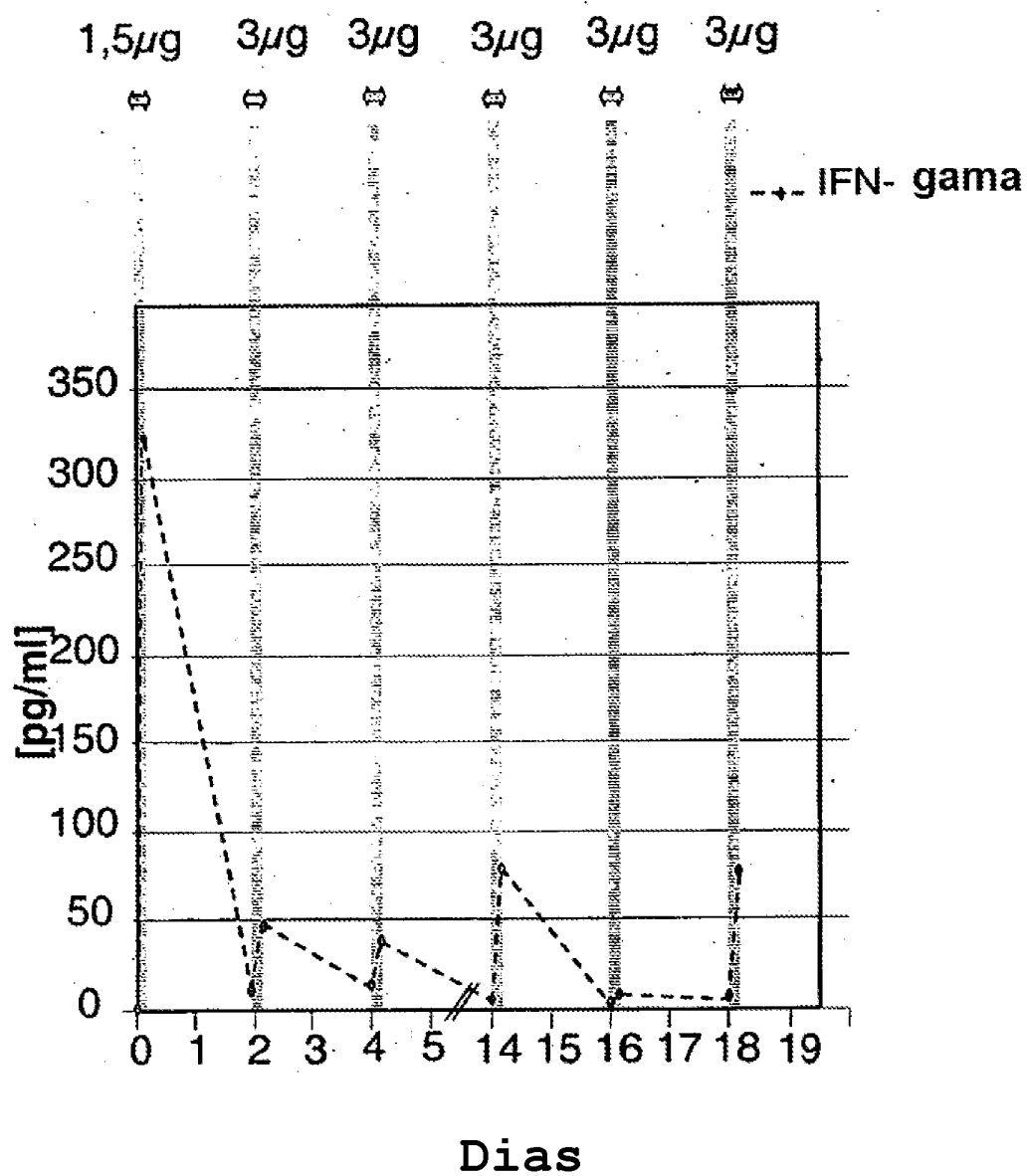


Figura 4

Doente 1003/IL-6

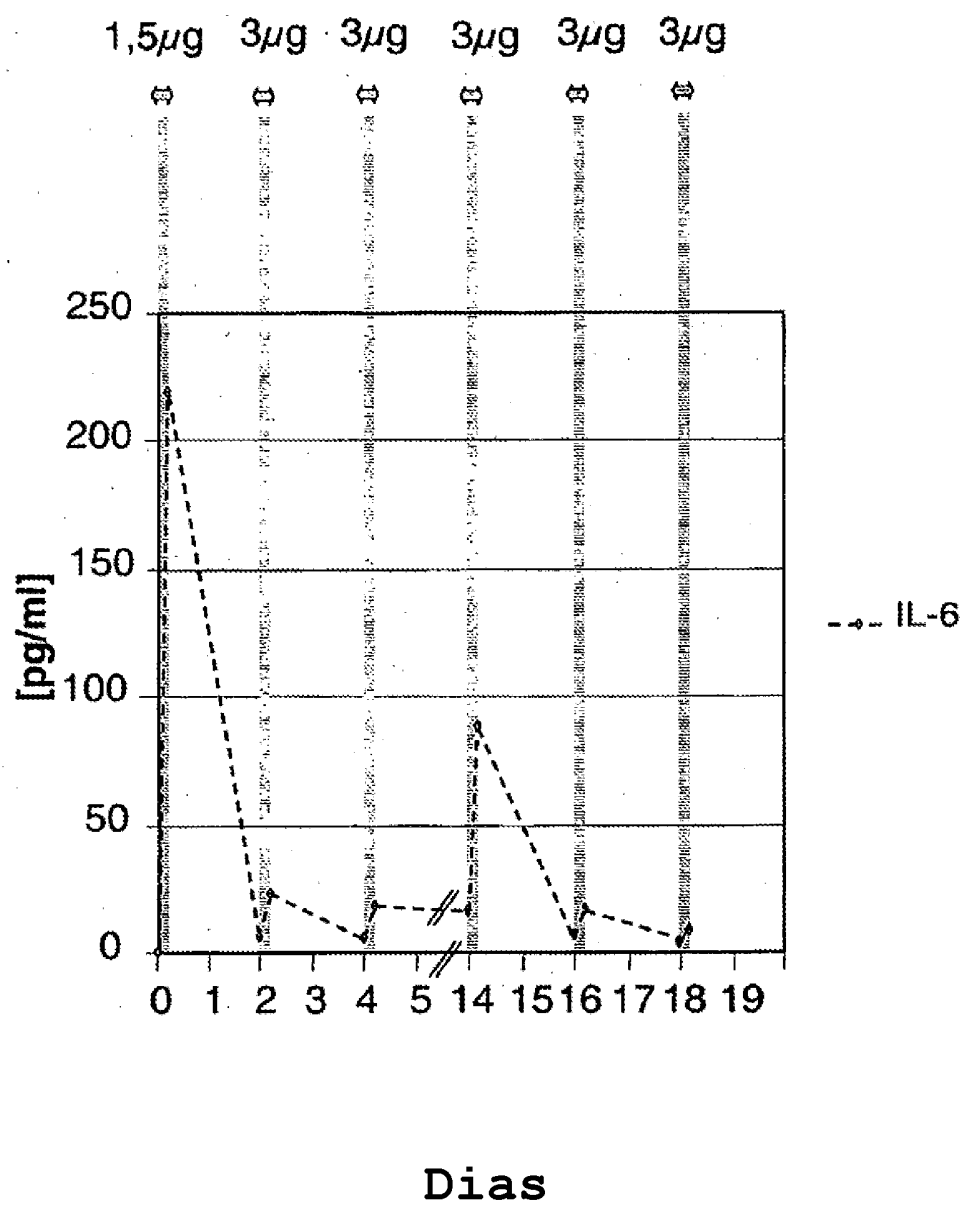


Figura 5

Doente 1003/IL-10

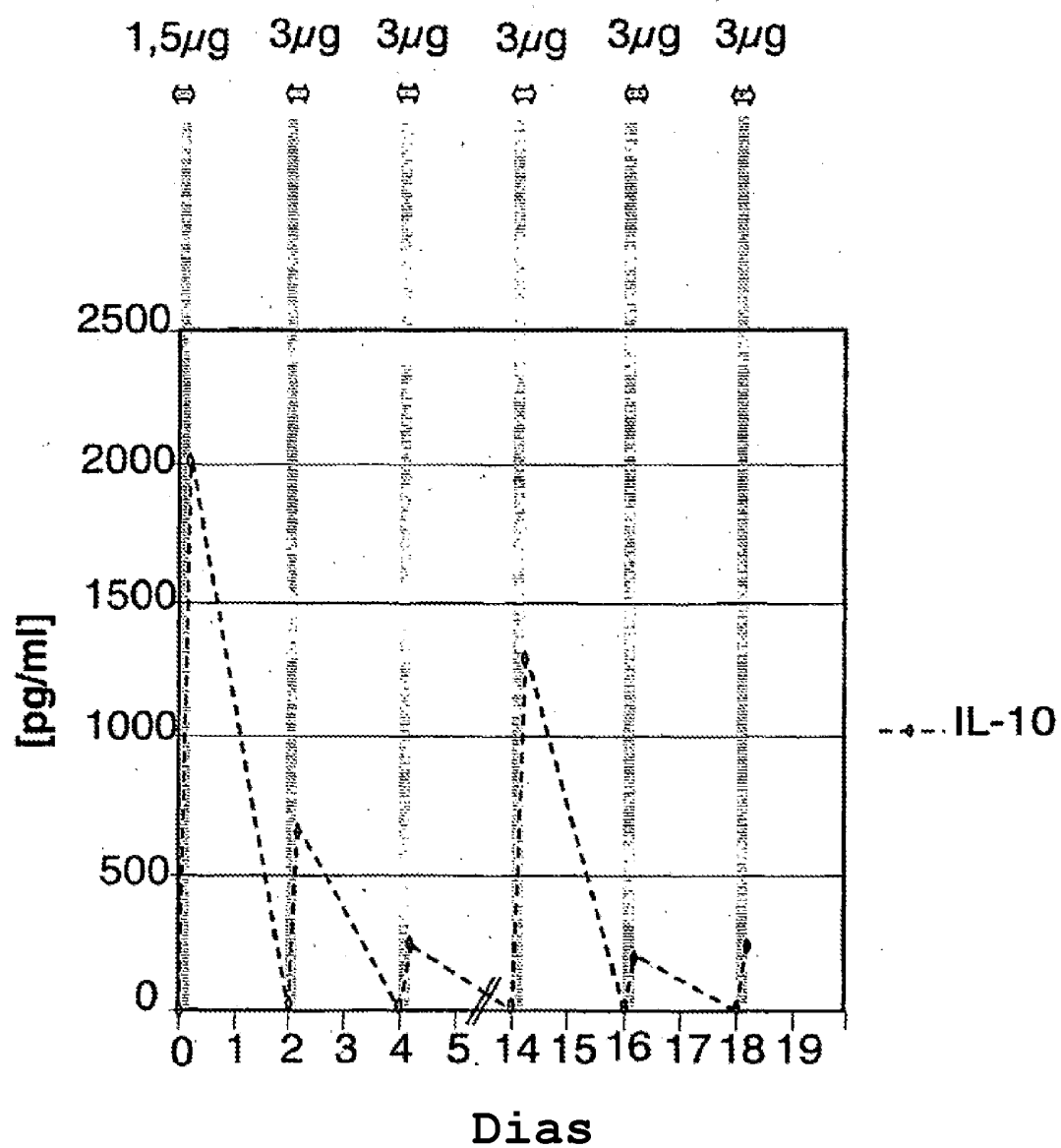


Figura 6

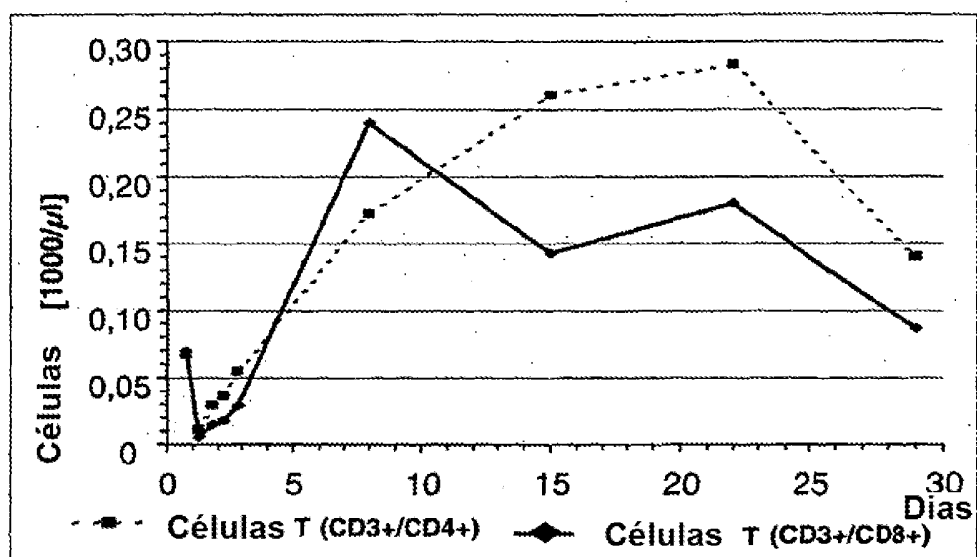


Figura 7

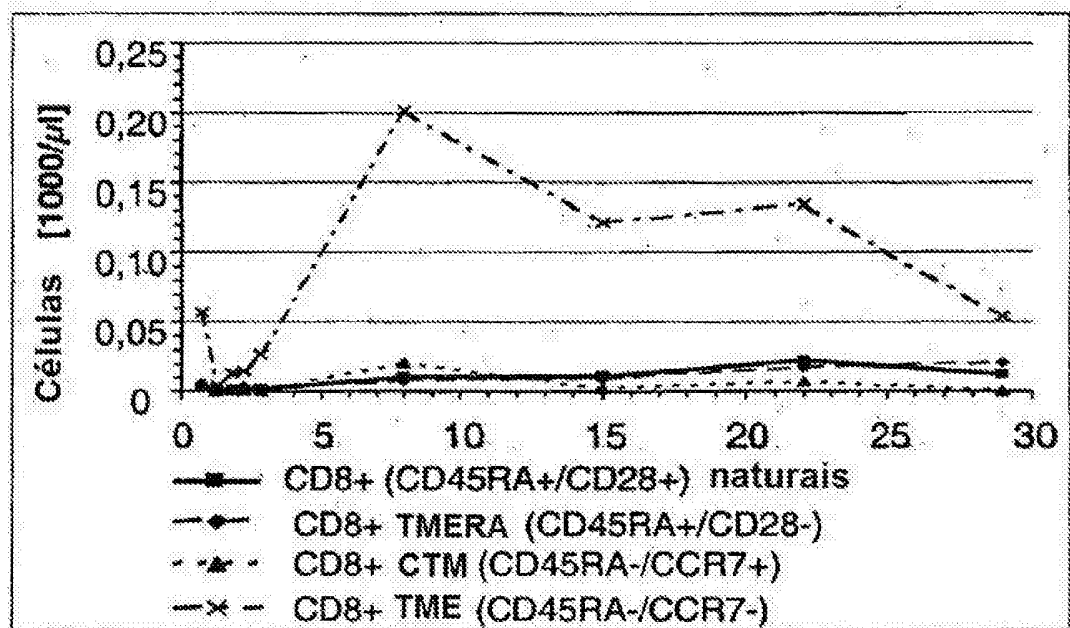


Figura 8

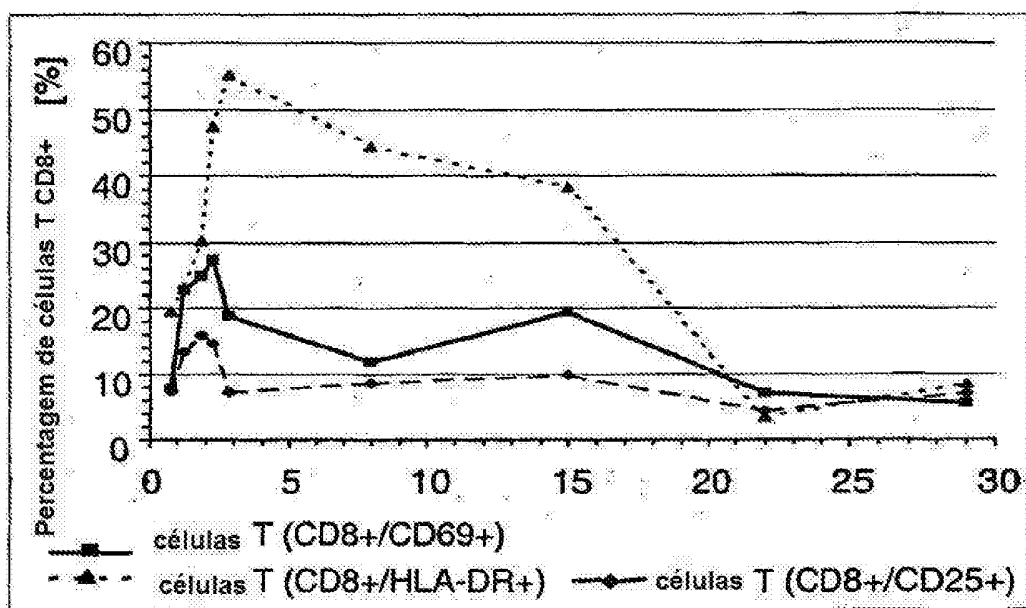


Figura 9

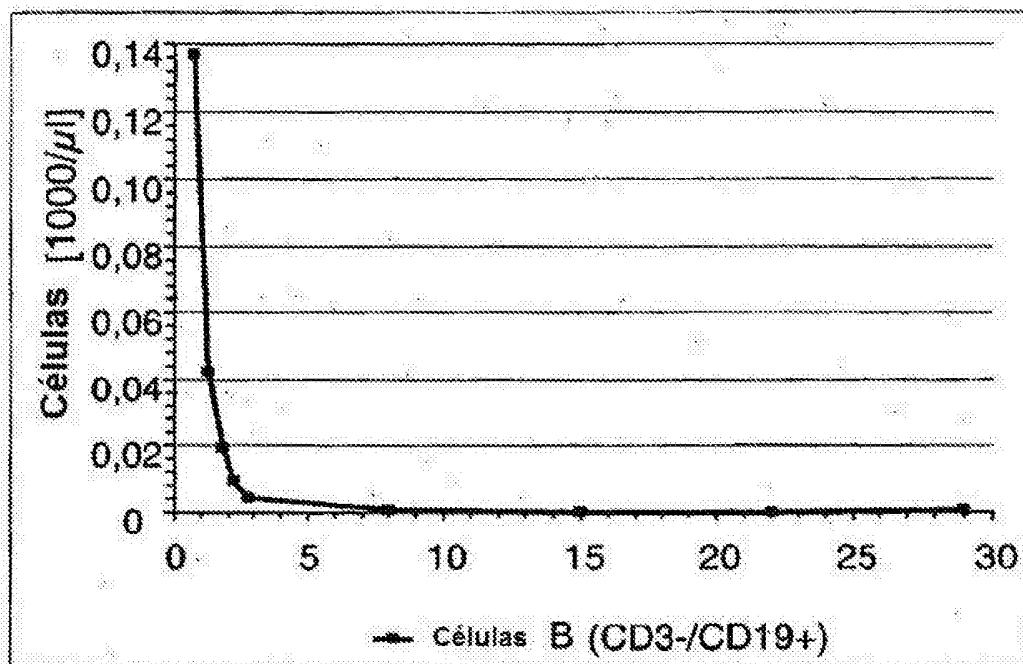
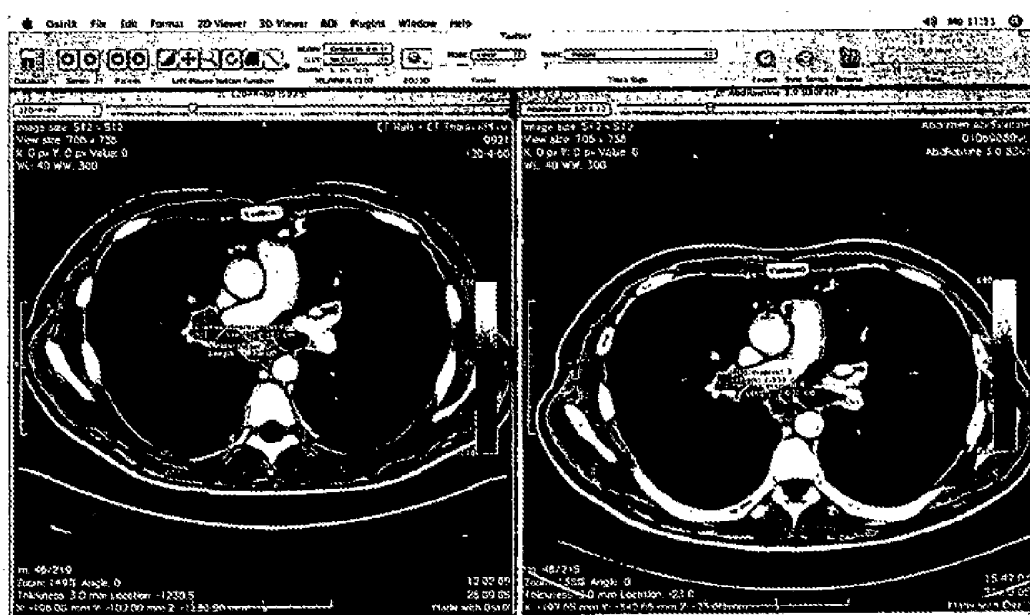


Figura 10

A

Antes do tratamento

passadas 4 semanas do tratamento



B

		Data 26.09			Data 31.10		
Lesão	Localização	a	b	Produto	a	b	Produto
1	Mediastino	2,8	1,4	3,92	2,1	1,1	2,31
2	Hilar r	2,8	2,5	7,00	2,1	1,9	3,99
3	Pulmonar r	3,4	1,5	5,10	1,8	1,0	1,80
4	Retroperitoneal	2,1	2,6	3,36	1,2	1,0	1,20
5	Iliacal l	3,6	2,4	8,64	2,1	1,2	2,53
6	Nucal l	1,3	2,0	1,30	0,8	0,6	0,48
		Soma		29,32	Soma		12,30
		SCR		dia 29			-58,0 %

Figura 11

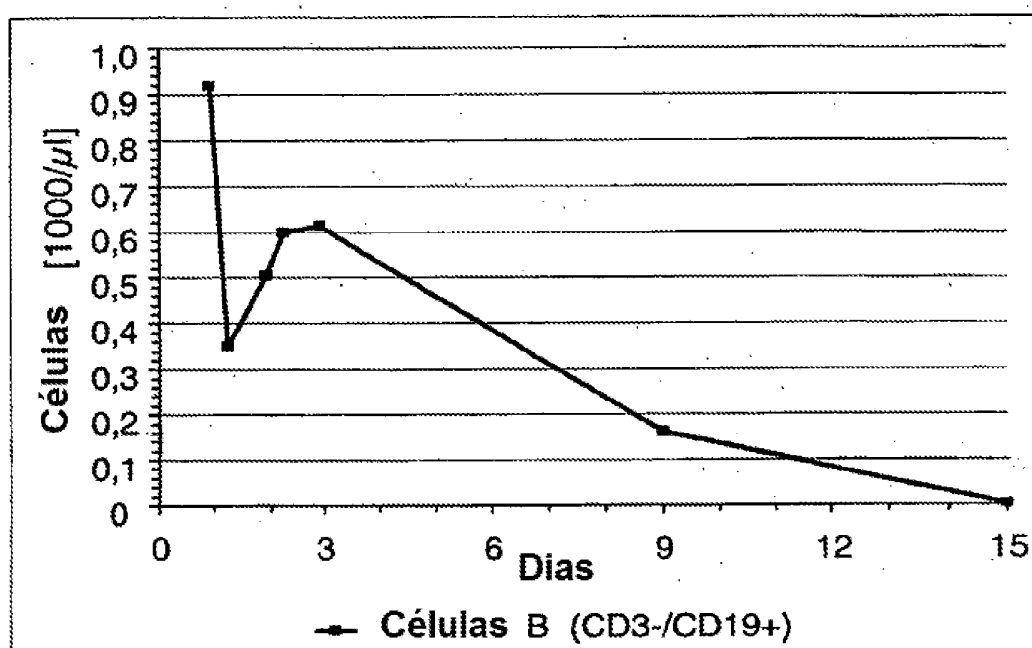
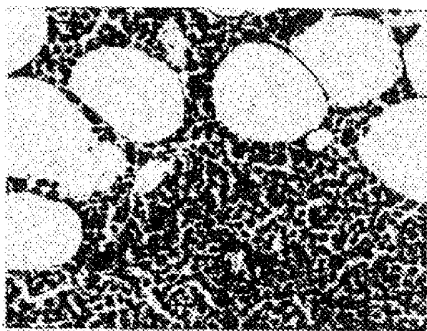


Figura 12

Antes do tratamento



2 Semanas após o tratamento

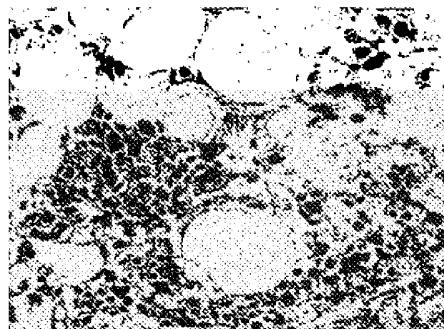
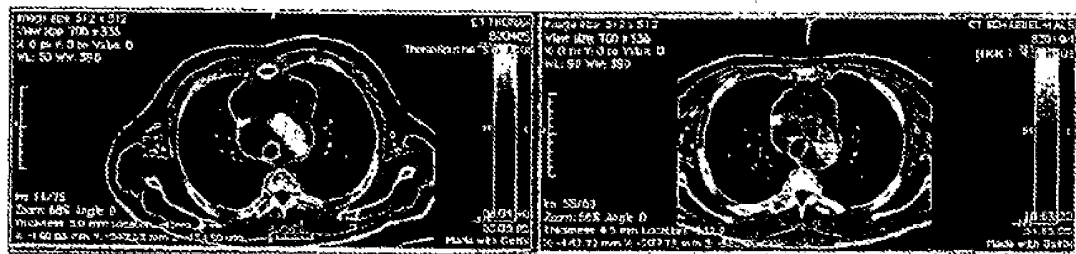


Figura 13

A

antes do tratamento

passadas 2 semanas do tratamento

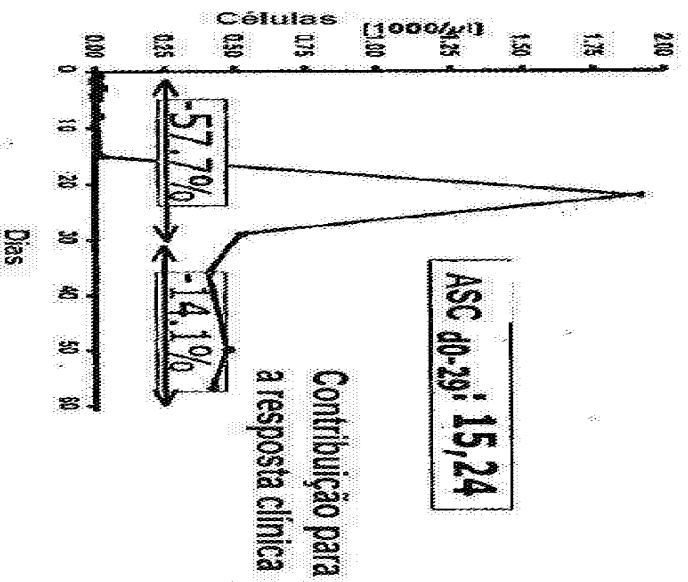


B

Lesão	Localização	Data 02.05			Data 31.05		
		a	b	Produto	a	b	Produto
1	Mediastino (1)	12,0	3,0	36,00	7,0	2,8	19,60
2	Mediastino (2)	4,1	4,0	16,40	3,4	2,2	7,48
3	Mediastino (3)	6,5	5,1	33,15	4,0	2,1	8,40
4	Mediastino (4)	3,3	3,0	9,90	2,1	1,5	3,15
5	Retroperitoneal	3,0	2,7	8,10	2,3	2,4	5,52
6	Mesentérico	1,9	1,5	2,85	1,0	1,3	1,30
			Soma	106,40		Soma	45,45
		SCR		dia 21			-57,2 %

Figura 14

109-002 Resposta completa



→ 105-003 Resposta parcial

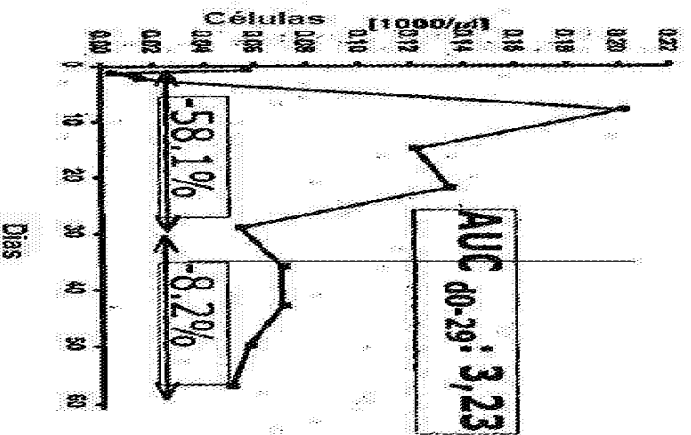


Figura 15

antes do tratamento passadas 4 semanas e passadas 8 semanas de tratamento

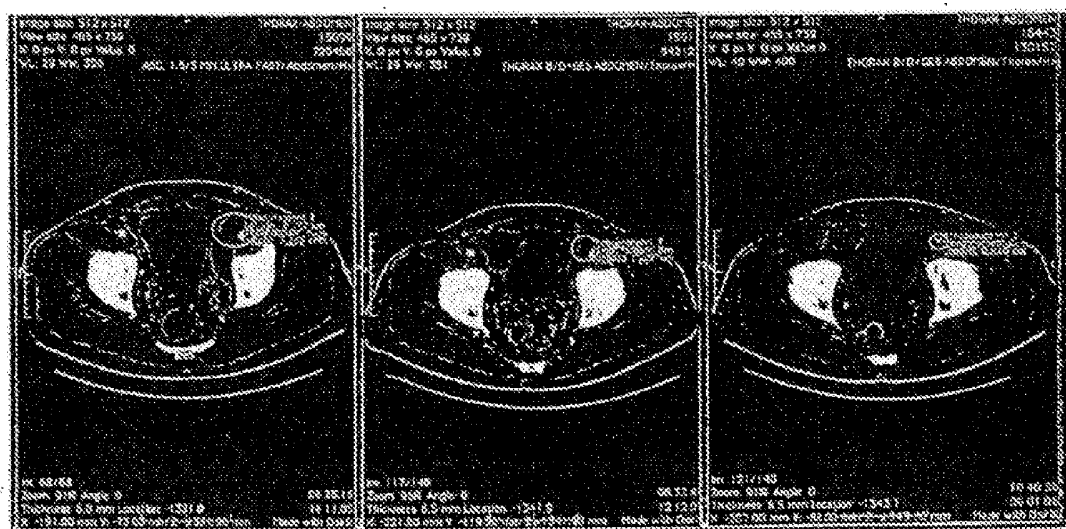
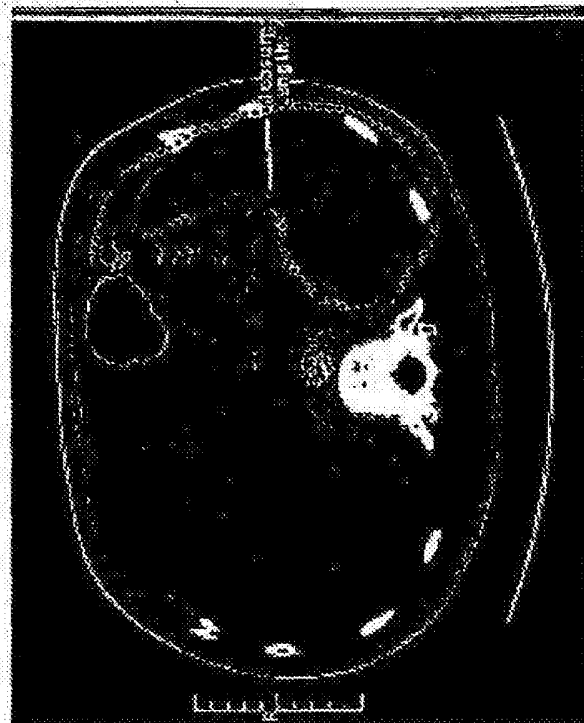


Figura 16

depois do tratamento



antes do tratamento

