

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.02.15	(73) Titular(es): DUKE UNIVERSITY 230 NORTH BUILDING, RESEARCH DRIVE, BOX 90083 DURHAM, NORTH CAROLINA 27708-0083 US
(30) Prioridade(s): 2005.02.15 US 653587 P 2005.07.22 US 702063 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2007.11.14	
(45) Data e BPI da concessão: 2015.08.05 222/2015	(72) Inventor(es): THOMAS F. TEDDER US NORIHITO YAZAWA PT HANNE GRON US YASUHITO HAMAGUCHI JP
	(74) Mandatário: NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS ANTI-CD19 E USOS EM ONCOLOGIA**

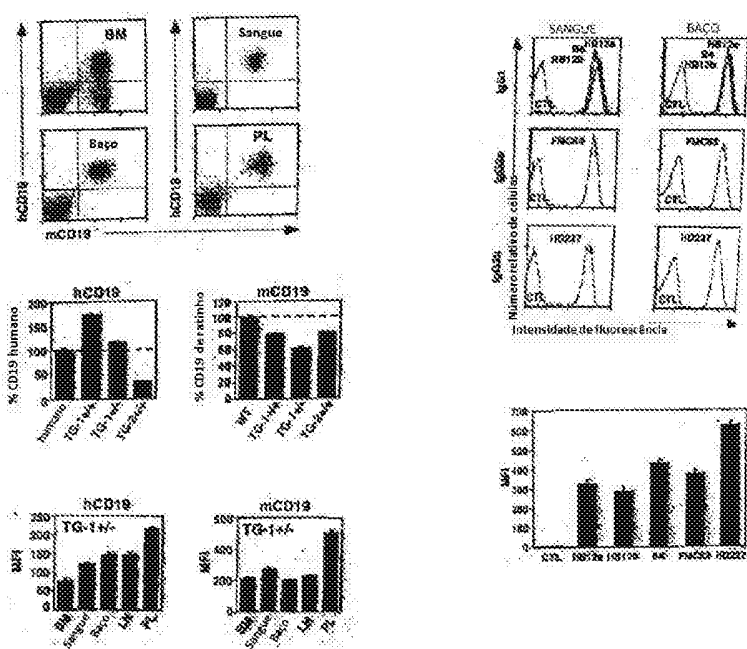
(57) Resumo:

A INVENÇÃO RELACIONA-SE COM COMPOSIÇÕES IMUNOTERAPÊUTICAS E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS E DISTÚRBIOS DAS CÉLULAS B EM INDIVÍDUOS HUMANOS, TAIS COMO, MAS NÃO SE LIMITANDO A, MALIGNIDADES DAS CÉLULAS B, USANDO ANTICORPOS TERAPÊUTICOS QUE SE LIGAM AO ANTIGÉNIO CD19 HUMANO E QUE PREFERENCIALMENTE MEDEIAM ADCC HUMANA. A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO ANTICORPOS ANTI-CD19 HUMANOS OU HUMANIZADOS DO ISOTIPO IGG2 OU IGG4 HUMANO QUE PREFERENCIALMENTE MEDEIA ADCC EM HUMANOS. A PRESENTE INVENÇÃO TAMBÉM SE RELACIONA COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO ANTICORPOS ANTI-CD19 QUIMERIZADOS DO ISOTIPO IGG1, IGG2, IGG3, OU IGG4 QUE MEDEIAM ADCC EM HUMANOS. EM FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS, A PRESENTE INVENÇÃO RELACIONA-SE COM COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO ANTICORPOS ANTI-CD19 MONOCLONAIS HUMANOS, HUMANIZADOS OU QUIMÉRICOS.

RESUMO

"ANTICORPOS ANTI-CD19 E USOS EM ONCOLOGIA"

A invenção relaciona-se com composições imunoterapêuticas e métodos para o tratamento de doenças e distúrbios das células B em indivíduos humanos, tais como, mas não se limitando a, malignidades das células B, usando anticorpos terapêuticos que se ligam ao antígeno CD19 humano e que preferencialmente medeiam ADCC humana. A presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 humanos ou humanizados do isotipo IgG2 ou IgG4 humano que preferencialmente medeia ADCC em humanos. A presente invenção também se relaciona com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 quimerizados do isotipo IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4 que medeiam ADCC em humanos. Em formas de realização preferidas, a presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 monoclonais humanos, humanizados ou quiméricos.



DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS ANTI-CD19 E USOS EM ONCOLOGIA"

1. INTRODUÇÃO

A presente invenção é direcionada para um anticorpo anti-CD19 para uso em métodos para o tratamento de distúrbios ou doenças das células B em indivíduos humanos, incluindo malignidades das células B, usando anticorpos terapêuticos que se ligam ao antigénio CD19 humano. Numa forma de realização preferida, os anticorpos anti-CD19 terapêuticos das composições e para uso nos métodos da invenção preferencialmente medeiam a citotoxicidade mediada por células dependente de antigénios em humanos (ADCC). A presente invenção é adicionalmente direcionada para composições compreendendo anticorpos anti-CD19 humanizados ou quiméricos isotipo humano IgG1 e/ou IgG3. A presente invenção é adicionalmente direcionada para essas composições que preferencialmente medeiam ADCC em humanos. A presente invenção também engloba anticorpos anti-CD19 monoclonais humanizados ou quiméricos.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Marcadores à superfície das células B têm sido geralmente sugeridos como alvos para o tratamento de distúrbios ou doenças das células B, doença autoimune, e rejeição de transplante. Exemplos de marcadores à superfície das células B incluem marcadores de superfície de leucócitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD53, CD72, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, e CD86. Anticorpos que se ligam especificamente

a alguns desses marcadores foram desenvolvidos, e alguns foram testados para o tratamento de doenças e distúrbios.

Por exemplo, terapias à base de anticorpo monoclonal (mAb) quimérico ou radiomarcado direcionadas contra a molécula CD20 de superfície da célula específica para células B maduras e as suas homólogas malignas têm mostrado ser uma forma eficaz de tratamento *in vivo* para o linfoma não de Hodgkin (Tedder et al., *Immunol. Today* 15:450-454 (1994); Press et al., *Hematology*, 221-240 (2001); Kaminski et al., *N. Engl. J. Med.*, 329:459-465 (1993); Weiner, *Semin. Oncol.*, 26:43-51 (1999); Onrust et al., *Drugs*, 58:79-88 (1999); McLaughlin et al., *Oncology*, 12:1763-1769 (1998); Reff et al., *Blood*, 83:435-445 (1994); Maloney et al., *Blood*, 90:2188-2195 (1997); Maloney et al., *J. Clin. Oncol.*, 15:3266-3274 (1997); Anderson et al., *Biochem. Soc. Transac.*, 25:705-708 (1997)). Também se verificou que a terapia com anticorpo monoclonal anti CD20 melhora as manifestações de artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, purpura trombocitopénica idiopática e anemia hemolítica, assim como outras doenças imunomediadas (Silverman et al., *Arthritis Rheum.*, 48:1484-1492 (2002); Edwards et al., *Rheumatology*, 40:1-7 (2001); De Vita et al., *Arthritis Rheumatism*, 46:2029-2033 (2002); Leandro et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 61:883-888 (2002); Leandro et al., *Arthritis Rheum.*, 46:2673-2677 (2001)). O anticorpo monoclonal LL-2, anti-CD22, demonstrou ser eficaz no tratamento de pacientes com linfoma agressivo e recidivante submetidos a tratamento quimioterapêutico (Goldenberg Patentes U.S. Nos: 6,134,982 e 6,306,393). O anticorpo anti-CD20 (IgG1), RITUXAN™, tem sido utilizado com sucesso no tratamento de certas doenças tais como púrpura trombocitopénica imune de adultos, artrite reumatoide, e anemia hemolítica autoimune (Cured et al., WO 00/67796). Apesar da eficácia desta terapia, a maioria das leucemias

linfoblásticas agudas (ALL) e muitas outras malignidades das células B ou não expressam CD20, expressam CD20 em baixos níveis, ou perderam a expressão de CD20 na sequência da imunoterapia de CD20 (Smith et al., *Oncogene*, 22:7359-7368 (2003)). Além disso, a expressão de CD20 não é indicativa de resposta a terapia anti-CD20 dado que somente metade dos pacientes de linfoma não de Hodgkin respondem à imunoterapia dirigida a CD20.

A molécula de CD19 humano é um recetor na superfície celular estruturalmente distinto expresso na superfície de células B humanas, incluindo, mas não se limitando a, células pré B, células B no início do desenvolvimento (isto é, células B imaturas), células B maduras através de diferenciação terminal em células plasmáticas, e células B malignas. O CD 19 é expresso pela maioria das leucemias linfoblásticas agudas (ALL) pré B, linfomas não de Hodgkins, leucemias linfocíticas crónicas (CLL) das células B, leucemias pró-linfocíticas, leucemia de células pilosas, leucemias linfocíticas agudas comuns, e algumas leucemias linfoblásticas agudas do tipo Null (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131:244-250 (1983), Loken et al., *Blood*, 70:1316-1324 (1987), Uckun et al., *Blood*, 71:13-29 (1988), Anderson et al., 1984. *Blood*, 63:1424-1433 (1984), Scheuermann, *Leuk. Lymphoma*, 18:385-397(1995)). A expressão de CD19 nas células plasmáticas sugere adicionalmente que pode ser expresso nos tumores das células B diferenciados tais como mieloma múltiplo, plasmocitomas, tumores de Waldenstrom (Grossbard et al., *Br. J. Haematol.*, 102:509-15(1998); Treon et al., *Semin. Oncol.*, 30:248-52(2003)). Ao contrário do CD20, o antigénio CD19 considerou-se ser expresso a níveis mais elevados e internalizado pelas células quando ligado por um anticorpo anti-CD19.

O antigénio CD 19 tem sido também um dos muitos alvos

propostos para imunoterapia. No entanto, a indisponibilidade percebida como um alvo devido à internalização celular, pensou-se ter apresentado obstáculos ao desenvolvimento de protocolos terapêuticos que podem ser usados com sucesso em indivíduos humanos. O anticorpo CLB-CD19 (mAb IgG2a de murino anti-CD19) mostrou inibir o crescimento de tumores humanos implantados em ratinhos atímicos (Hooijberg et al., Cancer Research, 55:840-846 (1995)). Noutro estudo, o anticorpo FMC63 monoclonal de murino (IgG2a) foi quimerizado usando uma região Fc de IgG1 humana. A administração destes anticorpos quiméricos a ratinhos SCID portadores de um linfoma das células B humano (modelo de xenotransplante) não induziu citotoxicidade mediada por complemento ou ADCC, mas resultou na morte significativa das células de tumor transplantadas (Geoffrey et al., Cancer Immunol. Immunother., 41:53-60 (1995)).

Os resultados obtidos usando modelos de xenotransplante de ratinho de implantação de tumor levou a estudos usando anticorpos anti-CD19 de murino em pacientes humanos. O anticorpo CLB-CD19 de murino foi administrado a seis pacientes diagnosticados com um linfoma progressivo não de Hodgkin que tinham falhado o tratamento convencional anterior (quimioterapia ou radioterapia). Estes pacientes foram administrados com doses totais de anticorpos variando desde 225 até 1.000 mg (Hekman et al., Cancer Immunol. immunotherapy, 32:364-372 (1991)). Embora as células tumorais circulantes tenham sido reduzidas temporariamente em dois pacientes após infusão do anticorpo, apenas um paciente alcançou remissão parcial após dois períodos de tratamento com anticorpo. Não puderam ser tiradas conclusões sobre a eficácia terapêutica deste pequeno grupo de pacientes refratários.

Subsequentemente, estes investigadores mostraram que os efeitos antitumorais de mAbs CD20 não conjugado são de longe superiores aos de mAbs CD 19 em modelos de transplante (Hooijberg et al., Cancer Res., 55:840-846 (1995); e Hooijberg et al., Cancer Res., 55:2627-2634 (1995)). Além disso, não observaram efeitos aditivos ou sinérgicos na incidência do tumor quando usaram mAbs CD19 e CD20 em combinação (Hooijberg et al., Cancer Res., 55:840-846 (1995)). Embora os modelos animais de xenotransplante sejam reconhecidos como fracos indicadores de prognóstico para a eficácia em indivíduos humanos, os resultados negativos obtidos nestes estudos animais desencorajou o interesse na terapia com anticorpos anti-CD19 nus.

O uso de imunotoxinas à base de anticorpo anti-CD19 produziu igualmente resultados desencorajadores. Nos primeiros ensaios clínicos, o anticorpo B4 anti-CD19 (mAb IgG1 de murino) foi conjugado com a toxina vegetal ricina e administrado a pacientes humanos com mieloma múltiplo que tinham falhado o tratamento convencional anterior (Grossbard et al., British Journal of Haematology, 102:509-515(1998)), linfoma não de Hodgkin avançado (Grossbard et al., Clinical Cancer Research, 5:2392-2398 (1999)), e malignidades refratárias das células B, (Grossbard et al., Blood, 79:576-585 (1992)). Estes ensaios geralmente demonstraram a segurança da administração do conjugado B4-ricina a humanos; No entanto, os resultados foram mistos e as taxas de resposta foram desencorajadoras em comparação com os ensaios clínicos com RITUXAN™ (Grossbard et al., Clinical Cancer Research, 5:2392-2398 (1999)). Adicionalmente, uma porção significativa dos pacientes desenvolveu uma resposta de anticorpo anti-ratinho humano ou uma resposta de anticorpo anti-ricina humano (HARA).

Noutro ensaio, sete pacientes com linfoma não de Hodgkin de

baixo grau previamente tratados com tratamento convencional foram tratados com o anticorpo CLB-CD19 de murino em combinação com infusão contínua de dose baixa de interleucina 2 (Vlasveld et al., Cancer, Immunol. Immunotherapy, 40:37-47 (1995)). Num paciente de leucemia ocorreu uma remissão parcial, e uma redução superior a 50% das células B circulantes foi observada. Os números de células B circulantes não variaram em 4 dos 5 restantes pacientes avaliados. Assim, a avaliação terapêutica dos anticorpos anti CD19 de murino e imunotoxinas à base do anticorpo anti-CD19 em humanos, geraram dados anedóticos que não puderam ser avaliados quanto à eficácia.

A Publicação Internacional No. WO 2005/012493 fornece proteínas de fusão do anticorpo anti-CD19 humanizado, quimérico e humano, e fragmentos destes que se ligam a um marcador das células B humanas. Esses anticorpos, proteínas de fusão e fragmentos destes são úteis para o tratamento e diagnóstico de vários distúrbios das células B, incluindo malignidades das células B e doenças autoimunes.

3. RESUMO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se com composições imunoterapêuticas e anticorpos para uso em métodos para o tratamento de doenças e distúrbios das células B em indivíduos humanos, tais como, mas não se limitando a, malignidades das células B, usando anticorpos terapêuticos que se ligam ao antígeno CD 19 humano e que preferencialmente medeiam ADCC em humanos. A presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 humanizados do isotipo humano IgG1 ou IgG3. A presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 humanizados do isotipo humano IgG1 ou IgG3 que preferencialmente medeiam ADCC em

humanos. A presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 quiméricos do isotipo IgG1 ou IgG3 que medeiam ADCC em humanos. Em formas de realização preferidas, a presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 monoclonais humanizados, ou quiméricos.

Formulações e regimes terapêuticos são descritos para tratar indivíduos humanos diagnosticados com malignidades das células B que derivam das células B e seus precursores, incluindo mas não se limitando a, leucemias linfoblásticas agudas (ALL), linfomas de Hodgkin, linfomas não de Hodgkins, leucemias linfocíticas crônicas das células B (CLL), mieloma múltiplo, linfoma folicular, linfoma de células do manto, leucemias pró-linfocíticas, leucemia de células pilosas, leucemias linfocíticas agudas comuns e algumas Leucemias linfoblásticas agudas de tipo Null.

Os anticorpos para uso nos métodos da invenção são demonstrados por meio de exemplos, usando um modelo de ratinho transgênico para avaliar imunoterapias dirigidas a CD19 em indivíduos humanos.

A invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti CD 19 monoclonal quimerizado ou humanizado que (a) é do isotipo humano IgG1 ou IgG3, ou (b) medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) em humanos, num transportador farmaceuticamente aceitável, em que o anticorpo compreende as sequências conforme estabelecido como os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 115 da SEQ ID NO:2 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 43 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:16, ou as sequências conforme

estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 114 de SEQ ID NO:4 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 44 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:18, em que uma substituição de aminoácido é introduzida numa ou mais das referidas sequências e em que o anticorpo é capaz de depletar as células B da medula óssea expressando CD 19.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 pode ser inferior a cerca de 1 mg/kg de peso corporal de paciente.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 pode ser superior a cerca de 2 mg/kg de peso corporal de paciente.

O anticorpo anti-CD19 que medeia ADCC pode ser do isotipo humano IgG1 ou IgG3.

O anticorpo anti-CD19 pode ter uma semivida de pelo menos 4 até 7 dias.

A composição pode compreender uma dose de 1500 mg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e o anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por uma via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.

A composição pode compreender uma dose de 375 mg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e o anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por uma via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.

A composição pode compreender uma dose de 1,5 mg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e o anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.

A composição pode compreender uma dose de 0,5 µg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e o anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.

O anticorpo anti-CD19 pode ser marcado de forma detetável, pode ser um anticorpo nu, pode ser conjugado a um composto terapêutico, pode ser conjugado a um agente citotóxico, ou pode ser conjugado a um agente de diagnóstico.

O anticorpo anti-CD19 pode ser biespecífico.

O anticorpo anti-CD19 biespecífico pode ter especificidade para se ligar a células efetoras.

A função ADCC do anticorpo anti-CD19 pode ser avaliada medindo a capacidade do anticorpo anti-CD19 de mediar a lise da célula alvo por células efetoras *in vitro*.

O anticorpo anti-CD19 pode compreender uma cadeia pesada consistindo numa sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.

O anticorpo anti-CD19 pode compreender a cadeia leve consistindo numa sequência com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:18.

A invenção também fornece um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado que (a) é do isotipo humano IgG1 ou IgG3, ou (b)

medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, em que o anticorpo compreende as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, 51 até 68 e 101 até 115 da SEQ ID NO:2 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 43 até 58, 74 até 80 e 113 até 121 da SEQ ID NO:16, ou as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, 51 até 68 e 101 até 114 da SEQ ID NO:4 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 44 até 58, 74 até 80 e 113 até 121 da SEQ ID NO:18, em que uma substituição de aminoácido é introduzida numa ou mais das referidas sequências, para uso num método de tratar uma malignidade das células B num paciente humano, em que o anticorpo é capaz de depletar as células B da medula óssea expressando CD 19.

O anticorpo anti-CD19 pode compreender uma cadeia pesada consistindo numa sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.

O anticorpo pode compreender a cadeia leve consistindo numa sequência com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:18.

O anticorpo pode ser capaz de depletar as células B circulantes.

A malignidade das células B pode ser leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células do manto, leucemia linfoblástica aguda de pré células B, ou leucemia linfoblástica dos precursores das células B.

O anticorpo anti-CD19 que medeia ADCC pode ser do isotipo humano IgG1 ou IgG3.

A malignidade das células B pode ser tratada antes da administração do anticorpo anti-CD19.

A malignidade das células B pode ser tratada com uma terapia que não uma terapia com anticorpo anti-CD19 subsequente à administração do anticorpo anti-CD19.

O tratamento da malignidade pode ser quimioterapia, radioimunoterapia, terapia de toxina, terapia de enzimas ativadoras do pró-fármaco, terapia de anticorpos, terapia potenciadora de monócitos ou macrófagos, terapia imunoreguladora, terapia de estatina da neovasculatura tumoral, terapia de caliqueamicina, terapia cirúrgica, ou qualquer combinação destas.

A invenção também fornece um anticorpo anti-CD19 monoclonal que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos compreendendo as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 115 da SEQ ID NO:2 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 43 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:16, ou as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 114 da SEQ ID NO:4 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 44 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:18, em que uma substituição de aminoácido é introduzida numa ou mais das referidas sequências e em que o anticorpo é capaz de depletar as células B da medula óssea expressando CD 19 para uso num regime para (a) tratar uma doença em fase precoce resultante de uma malignidade das células B num paciente humano, ou (b) tratar uma malignidade das células B num indivíduo humano em que o

indivíduo humano não recebeu previamente tratamento para a malignidade, a malignidade das células B é positiva para CD 19 ou o humano tem uma contagem de monócitos de pelo menos 1 por dL, em que o regime administrado depleta as células B circulantes.

O anticorpo pode compreender uma cadeia pesada consistindo numa sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.

O anticorpo anti-CD19 pode compreender a cadeia leve consistindo numa sequência com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:18.

Uma terapia que não uma terapia com anticorpo anti-CD19 pode ser subsequentemente administrada ao humano.

A terapia pode ser quimioterapia, radioterapia, terapia à base de toxinas, terapia baseada em radioquímica ou terapia cirúrgica.

O regime pode compreender a administração do anticorpo como um agente terapêutico único, em combinação com outro agente terapêutico, ou em combinação com um agente que reduz os efeitos secundários tóxicos.

O regime pode compreender a administração repetida do anticorpo.

O anticorpo anti-CD19 pode ter uma semivida que é de pelo menos 4 até 7 dias.

O anticorpo anti-CD19 pode ser um anticorpo do isotipo IgG1 ou IgG3 humano.

O anticorpo anti-CD19 pode ser um anticorpo humanizado.

A malignidade das células B pode ser um linfoma não de Hodgkin (NHL) de subtipo de células B incluindo NHL de baixo grau/folicular, NHL linfocítico pequeno (SL), NHL de grau intermédio/folicular, NHL difuso de grau intermédio, NHL imunoblástico de alto grau, NHL linfoblástico de alto grau, NHL de célula pequena não clivada de alto grau e NHL de doença volumosa; Linfoma de Burkitt; mieloma múltiplo; leucemia linfoblástica aguda pré-B e outras malignidades que derivam dos precursores iniciais das células B; leucemia linfocítica aguda comum; leucemia linfocítica crónica; leucemia de células pilosas; Leucemia linfoblástica aguda de tipo Null; Macroglobulinémia de Waldenstrom; e leucemia pró-linfocítica; doença da cadeia leve; plasmocitoma; mieloma osteoclerótico; leucemia de células plasmáticas; gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS); mieloma múltiplo latente (SMM); mieloma múltiplo indolente (IMM); ou linfoma de Hodgkin.

O regime pode compreender ainda a administração de um composto que potencia a função dos monócitos ou macrófagos.

O humano pode estar imunocomprometido.

O anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por via parentética, intraperitoneal, ou intramuscular.

O anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por via intravenosa ou subcutânea.

O anticorpo anti-CD19 pode ser administrado por via subcutânea numa dose de 37,5 mg/m² ou menos.

O anticorpo anti-CD19 pode ser administrado numa dose de 1,5 mg/m² ou menos.

O regime pode compreender mais de uma administração do anticorpo anti-CD19 ao humano.

O regime pode compreender ainda a administração de um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-CD22, um anticorpo anti-CD52, ou qualquer combinação destes.

Numa forma de realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado, do isotipo humano IgG1 ou IgG3 num transportador farmacêuticamente aceitável. Numa outra forma de realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 num transportador farmacêuticamente aceitável. Em formas de realização relacionadas, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 é menos de 1 mg/kg de peso corporal de paciente. Em outras formas de realização relacionadas, uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 é maior que 2 mg/kg de peso corporal do doente.

De acordo com um aspeto, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, num transportador farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode compreender um anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, e/ou citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou atividade apoptótica num transportador farmacêuticamente aceitável.

A presente invenção relaciona-se com anticorpos para uso num método para tratar uma malignidade das células B num humano compreendendo administrar a um humano com essa necessidade um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 numa quantidade suficiente para depletar as células B em circulação. A presente invenção relaciona-se também com anticorpos para uso num método para tratar uma malignidade das células B num humano compreendendo administrar a um humano com essa necessidade um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos numa quantidade suficiente para depletar as células B em circulação. A presente invenção relaciona-se com anticorpos para uso num método para tratar uma malignidade das células B num paciente humano compreendendo a administração de um regime terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 a um paciente humano com necessidade desse tratamento.

Numa forma de realização, a presente invenção é direcionada para o tratamento de uma malignidade das células B num paciente humano compreendendo a administração de um regime terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, a um paciente humano com necessidade desse tratamento. Numa outra forma de realização, a presente invenção é direcionada para o tratamento de uma doença num estágio inicial resultante de uma malignidade das células B num paciente humano compreendendo a administração de um regime terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, a um humano com necessidade desse tratamento. Numa forma de realização adicional, a presente invenção é

direcionada para o tratamento de uma malignidade das células B num paciente humano compreendendo a administração de um regime terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, a um indivíduo humano com necessidade desse, em que o indivíduo humano não recebeu previamente tratamento para a malignidade. Ainda noutra forma de realização, a presente invenção é direcionada para o tratamento de uma malignidade das células B num paciente humano compreendendo a administração de um regime terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, a um paciente humano com necessidade desse tratamento, em que a malignidade das células B é positiva para CD 19. Numa forma de realização adicional, a presente invenção é direcionada para o tratamento de uma malignidade das células B num paciente humano compreendendo a administração de um regime terapêuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, a um paciente humano com necessidade desse tratamento, em que o paciente humano tem uma contagem de monócitos pelo menos 1 por dL de sangue em circulação.

3.1 DEFINIÇÕES

Como aqui usados, os termos "anticorpo" e "anticorpos" (imunoglobulinas) referem-se a anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) formados a partir de pelo menos dois anticorpos intactos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos camelizados, anticorpos quiméricos, Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos de

cadeia simples, anticorpos de domínio simples, anticorpos de domínio, fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos de anticorpo que exibem a desejada atividade biológica, Fvs ligados por dissulfureto (sdFv), e anticorpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-Id para anticorpos da invenção), intracorpos, e fragmentos de ligação a epítipo de qualquer dos acima. Em particular, os anticorpos incluem moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente ativos de moléculas de imunoglobulina, isto é, moléculas que contêm um sítio de ligação a antígeno. Moléculas de imunoglobulina podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) ou subclasse.

Os anticorpos nativos são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 Dalton, compostos por duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve está ligada a uma cadeia pesada através de uma ligação dissulfureto covalente, enquanto que o número de ligações dissulfureto varia entre as cadeias pesadas de diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e leve tem também pontes de dissulfureto intracadeia regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem numa extremidade um domínio variável (VH) seguido por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável numa extremidade (VL) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante de uma cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos particulares de aminoácidos formam uma interface entre os domínios variáveis da cadeia leve e pesada. Esses anticorpos podem ser derivados de qualquer mamífero, incluindo, mas não se

limitando a, humanos, macacos, porcos, cavalos, coelhos, cães, gatos, ratinhos, etc.

O termo "variável" refere-se ao facto de certas porções dos domínios variáveis diferirem grandemente na sequência entre os anticorpos e são responsáveis pela especificidade de ligação de cada anticorpo específico ao seu antigénio específico. No entanto, a variabilidade não está homogeneamente distribuída ao longo dos domínios variáveis dos anticorpos. Está concentrada em segmentos chamados Regiões Determinantes de Complementaridade (CDRs) nos domínios variáveis tanto na cadeia leve como na cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas dos domínios variáveis são chamadas regiões de estrutura (FR). Os domínios variáveis das cadeias leve e pesada nativas compreendem cada uma quatro regiões FR, adotando maioritariamente uma configuração de folha- β , ligada por três CDRs, que formam ansas que ligam, e em certos casos formam parte, da estrutura de folha- β . As CDRs em cada cadeia são mantidas juntas em grande proximidade pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação ao antigénio dos anticorpos (ver, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Os domínios constantes não estão geralmente envolvidos diretamente na ligação ao antigénio, mas podem influenciar a afinidade de ligação ao antigénio e podem apresentar várias funções efectoras, tais como participação do anticorpo em ADCC.

O termo "região hipervariável" quando aqui usado refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao seu antigénio. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (por

exemplo, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) e/ou aqueles resíduos de uma "ansa hipervariável" (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)). "Estrutura" ou resíduos "FR" são aqueles resíduos do domínio variável que não os resíduos da região hipervariável como aqui definido, e incluem anticorpos quiméricos, humanizados, humanos, de domínio, diacorpos, vacicorpos, anticorpos lineares, e anticorpos biespecíficos.

O termo "anticorpo monoclonal" como aqui usado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto no caso de possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, e são dirigidos contra um único sítio antigénico. Além disso, ao contrário de preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que incluem tipicamente anticorpos diferentes dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. Para além da sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos por serem sintetizados por células de hibridoma, não contaminadas por outras células produtoras de imunoglobulinas. Alternativamente, o anticorpo monoclonal pode ser produzido por células estavelmente ou temporariamente transfetadas com os genes

da cadeia pesada e leve que codificam o anticorpo monoclonal.

O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser entendido como necessitando de modificação do anticorpo por qualquer método específico. O termo "monoclonal" é aqui usado para se referir a um anticorpo que é derivado de uma população clonal de células, incluindo qualquer clone de eucariota, procariota, ou de fago, e não o método pelo qual o anticorpo foi modificado. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma descrito primeiro por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), ou podem ser feitos por qualquer método de ADN recombinante (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 4,816,567), incluindo isolamento a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos usando as técnicas descritas em Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por exemplo. Estes métodos podem ser usados para produzir anticorpos monoclonais de mamífero, quiméricos, humanizados, humanos, de domínio, diacorpos, vacicorpos, anticorpos lineares, e anticorpos biespecíficos.

O termo anticorpos "quiméricos" inclui anticorpos em que pelo menos uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpos específica, e pelo menos uma outra porção da(s) cadeia(s) é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpos, assim como fragmentos desses anticorpos, desde

que exibam a desejada atividade biológica (Patente U.S. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem anticorpos "primatizados" compreendendo sequências de ligação a antigénio de domínio variável derivadas de um primata não-humano (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, tal como babuíno, macaco Rhesus ou cinomolgo) e sequências da região constante humana (Patente U.S. No. 5,693,780).

Formas "humanizadas" de anticorpos não-humanos (por exemplo, de murino) são anticorpos quiméricos que contêm a sequência mínima derivada de imunoglobulinas não-humanas. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas (anticorpo recetor) em que os resíduos de uma região hipervariável do recetor são substituídos por resíduos de uma região hipervariável de uma espécie não humana (anticorpo dador) tal como ratinho, ratazana, coelho ou primata não humano com a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas. Em alguns casos, os resíduos da região de estrutura (FR) da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo recetor ou no anticorpo dador. Estas modificações são feitas para refinar ainda mais o desempenho do anticorpo. Em geral, o anticorpo humanizado vai compreender substancialmente todos ou pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, nos quais todas ou substancialmente todas as ansas hipervariáveis correspondem às de uma imunoglobulina não humana e todas ou substancialmente todas as FRs são as de uma sequência de imunoglobulina humana. Em certas formas de realização, o anticorpo humanizado vai compreender pelo menos uma porção de uma região constante (Fc) de imunoglobulina, tipicamente

a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, ver, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); e Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Um "anticorpo humano" pode ser um anticorpo derivado de um humano ou um anticorpo obtido a partir de um organismo transgênico que foi "modificado" para produzir anticorpos humanos específicos em resposta a um desafio antigénico e podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica. De acordo com técnicas preferidas, elementos de locais de cadeias pesadas e leves humanas são introduzidos em estirpes do organismo derivado de linhas de células estaminais embrionárias que contêm disrupções direcionadas dos locais das cadeias pesada e leve endógenas. O organismo transgênico pode sintetizar anticorpos humanos específicos para antigénios humanos, e o organismo pode ser usado para produzir hibridomas secretores de anticorpos humanos. Um anticorpo humano pode também ser um anticorpo em que as cadeias pesadas e leves são codificadas por uma sequência de nucleótidos derivada de uma ou mais fontes de ADN humano. Um anticorpo totalmente humano pode também ser construído por métodos genéticos ou de transfeção cromossômica, assim como tecnologia de apresentação de fago, ou células B ativadas *in vitro*, em que todos são conhecidos na técnica.

O antigénio "CD19" refere-se a um antigénio de cerca de 90 kDa identificado, por exemplo, pelo anticorpo HD237 ou B4 (Kiesel et al., *Leukemia Research II*, 12:1119 (1987)). CD19 encontra-se em células ao longo da diferenciação de células da linhagem B a partir do estágio de células estaminais ao longo da diferenciação terminal em células plasmáticas, incluindo mas não se limitando a, células pré B, células B (incluindo células B naïve, células B estimuladas por

antigénio, células B de memória, células plasmáticas, e linfócitos B) e células dendríticas foliculares. CD19 é também encontrado em células B em tecido fetal humano. Em formas de realização preferidas, o antigénio CD 19 direcionado pelos anticorpos da invenção é o antigénio CD19 humano.

"Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" e "ADCC" refere-se a uma reação mediada por células em que células citotóxicas não específicas (por exemplo, células Natural Killer (NK), neutrófilos, e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado a uma célula alvo e subsequentemente causam a lise da célula alvo. Em formas de realização preferidas, essas células são células humanas. Embora sem pretender estar limitado a nenhum mecanismo de ação específico, estas células citotóxicas que mediam ADCC geralmente expressam recetores Fc (FcRs). As células primárias para mediar ADCC, células NK, expressam FcγRIII, ao passo que monócitos expressam FcγRI, FcγRII, FcγRIII e/ou FcγRIV. A expressão de FcR em células hematopoiéticas é resumida em Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para avaliar a atividade ADCC de uma molécula, um ensaio de ADCC *in vitro*, tal como o descrito na Patente U.S. No. 5,500,362 ou 5,821,337 pode ser realizado. Células efetoras úteis para esses ensaios incluem células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células Natural Killer (NK). Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC das moléculas de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al., *PNAS (EUA)*, 95:652-656 (1998).

"Citotoxicidade dependente do complemento" ou "CDC" refere-se à capacidade de uma molécula iniciar a ativação do complemento e lisar um alvo na presença do complemento. A

via de ativação do complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) complexada com um antigénio cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio de CDC, por exemplo, como descrito em Gazzano-Santaro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996), pode ser realizado.

"Células efetoras" são leucócitos que expressam um ou mais FcRs e realizam funções efetoras. Preferencialmente, as células expressam pelo menos FcγRI, FcγRII, FcγRIII e/ou FcγRIV e realizam função efetora de ADCC. Exemplos de leucócitos humanos que medeiam ADCC incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC), células natural killer (NK), monócitos, células T citotóxicas e neutrófilos; com PBMCs e células NK sendo preferidas. Em formas de realização preferidas, as células efetoras são células humanas.

Os termos "recetor Fc" ou "FcR" são usados para descrever um recetor que se liga à região Fc de um anticorpo. O FcR preferido é um FcR humano de sequência nativa. Além disso, um FcR preferido é um que se liga a um anticorpo IgG (um recetor gama) e inclui recetores das subclasses FcγRI, FcγRII, FcγRIII, e FcγRIV, incluindo variantes alélicas e alternativamente formas que sofreram "splicing" destes recetores. Recetores FcγRII incluem FcγRIIA (um "recetor ativante") e FcγRIIB (um "recetor inibidor"), que têm sequências de aminoácidos semelhantes que diferem principalmente nos seus domínios citoplasmáticos. O recetor FcγRIIA ativador contém um motivo de ativação de imunorecetor à base de tirosina (ITAM) no seu domínio citoplasmático. O recetor FcγRIIB inibidor contém um motivo de inibição de imunorecetor à base de tirosina (ITIM) no seu domínio citoplasmático. (Ver, Daëron, Annu. Rev.

Immunol., 15:203-234 (1997)). FcRs são revistos em Ravetech and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); e de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Outros FcRs, incluindo aqueles a serem identificados no futuro, estão englobados no termo "FcR" aqui. O termo também inclui o recetor neonatal, FcRn, que é responsável pela transferência de IgGs maternas para o feto (Guyer et al., Immunol., 117:587 (1976) e Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)).

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um sítio de ligação e de reconhecimento de antigénio completo. Esta região consiste num dímero de um domínio variável da cadeia pesada e da cadeia leve em associação próxima, não covalente ou covalente. É nesta configuração que as três CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação a antigénio à superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação a antigénio ao anticorpo. No entanto, mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo apenas três CDRs específicas para um antigénio) tem a capacidade de reconhecer e se ligar a antigénio, embora com menor afinidade do que o sítio de ligação inteiro.

"Afinidade" de um anticorpo para um epitopo a ser usado no(s) tratamento(s) aqui descrito é um termo bem entendido na técnica e significa a extensão, ou força, de ligação do anticorpo ao epitopo. A afinidade pode ser medida e/ou expressa de várias maneiras conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, constante de dissociação de equilíbrio (KD ou Kd), constante de dissociação de equilíbrio aparente (KD' ou Kd'), e IC50 (quantidade necessária para exercer 50% de inibição num ensaio de competição). Entende-se que, para os fins desta invenção, afinidade é a afinidade média para uma dada população de

anticorpos que se ligam a um epitopo. Valores de KD' aqui indicados em termos de mg de IgG por mL ou mg/mL indicam mg de Ig por mL de soro, embora plasma possa ser usado. Quando afinidade de anticorpo é usada como uma base para administração dos métodos de tratamento aqui descritos, ou seleção para os métodos de tratamento aqui descritos, a afinidade de anticorpo pode ser medida antes e/ou durante o tratamento, e os valores obtidos podem ser usados por um médico para avaliar se um paciente humano é um candidato apropriado para tratamento.

Um "epitopo" é um termo bem conhecido na técnica e significa qualquer porção química que exhibe ligação específica a um anticorpo. Um "epitopo" pode também compreender um antígeno, que é uma porção ou molécula que contém um epitopo, e, como tal, também se liga especificamente ao anticorpo.

Um "marcador de superfície de célula B" como aqui usado é um antígeno expressado à superfície de uma célula B que pode ser direcionado com um agente que se liga a ele. Marcadores de superfície das células B exemplificativos incluem os marcadores CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD37, CD53; CD72, CD73, CD74, CD75, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, e CD86 de superfície de leucócito. O marcador de superfície de células B de interesse particular é preferencialmente expresso em células B comparado com outros tecidos que não células B de um mamífero e pode ser expresso nas células B precursoras e nas células B maduras. Numa forma de realização, o marcador preferido é CD 19, que se encontra nas células B ao longo da diferenciação da linhagem desde o estágio de célula pró/pré-B até ao estágio de célula plasmática terminalmente diferenciada.

O termo "semivida do anticorpo" como aqui usado significa uma propriedade farmacocinética de um anticorpo que é uma medida do tempo médio de sobrevivência das moléculas de anticorpo a seguir à sua administração. A semivida do anticorpo pode ser expressa como o tempo necessário para eliminar 50 por cento de uma quantidade conhecida de imunoglobulina do organismo de um paciente ou de um dos seus compartimentos específicos, por exemplo, como medido no soro, isto é, semivida de circulação, ou noutros tecidos. A semivida pode variar de uma imunoglobulina ou classe de imunoglobulinas para outra. Em geral, um aumento na semivida do anticorpo resulta num aumento do tempo de residência médio (MRT) em circulação para o anticorpo administrado.

O termo "isotipo" refere-se à classificação de um anticorpo. Os domínios constantes dos anticorpos não estão envolvidos na ligação, a antigénio, mas apresentam várias funções efectoras. Dependendo da sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada, um dado anticorpo, ou imunoglobulina pode ser atribuída a uma das cinco principais classes de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Muitas destas classes podem também ser ainda divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG1 (gama 1), IgG2 (gama 2), IgG3 (gama 3), e IgG4 (gama 4), e IgA1 e IgA2. As regiões constantes da cadeia pesada que correspondem às diferentes classes de imunoglobulinas são chamadas de α , δ , ϵ , γ , e μ , respetivamente. As estruturas e configurações tridimensionais das diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas. Das várias classes de imunoglobulinas humanas, apenas as IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, e IgM humanas são conhecidas por ativar o complemento. As IgG1 e IgG3 humanas são conhecidas por mediar ADCC em humanos.

Como aqui usado, o termo "imunogenicidade" significa que um composto é capaz de provocar uma resposta imune (estimulando a produção de anticorpos específicos e/ou proliferação de células T específicas).

Como aqui usado, o termo "antigenicidade" significa que um composto é reconhecido por um anticorpo ou pode ligar-se a um anticorpo e induzir uma resposta imune.

Como aqui usado, o termo "avidez" é uma medida da força de ligação total (isto é, ambos os braços do anticorpo) com que um anticorpo se liga a um antígeno. A avidez do anticorpo pode ser determinada medindo a dissociação da ligação antígeno-anticorpo em excesso de antígeno usando qualquer meio conhecido na técnica, tal como, mas não se limitando a, por modificação de anticorpo fluorescente indireto como descrito por Gray et al., J. Virol. Meth., 44:11-24. (1993).

Pelos termos "tratar," "tratando" ou "tratamento de" (ou termos gramaticalmente equivalentes) entende-se que a gravidade da condição do indivíduo é reduzida ou pelo menos parcialmente melhorada ou atenuada e/ou que algum alívio, mitigação ou diminuição de pelo menos um sintoma clínico é conseguido e/ou há inibição ou retardamento da progressão da doença e/ou prevenção ou atraso do início de uma condição ou doença. Assim, os termos "tratar," "tratando" ou "tratamento de" (ou termos gramaticalmente equivalentes) referem-se a ambos os regimes de tratamento terapêutico e profilático.

Como aqui usado, uma "quantidade suficiente" ou "uma quantidade suficiente para" conseguir um resultado específico refere-se a uma quantidade de um anticorpo ou

composição da invenção que é eficaz para produzir um efeito desejado, que é opcionalmente um efeito terapêutico (isto é, por administração de uma quantidade terapeuticamente eficiente). Por exemplo, uma "quantidade suficiente" ou "uma quantidade suficiente para" pode ser uma quantidade que é eficaz para depletar células B.

Uma quantidade "terapeuticamente eficaz" como aqui usado é uma quantidade que proporciona uma melhoria ou benefício a um indivíduo. Alternativamente indicado, uma quantidade "terapeuticamente eficaz" é uma quantidade que proporciona algum alívio, mitigação, e/ou diminuição de pelo menos um sintoma clínico. Sintomas clínicos associados a distúrbios que podem ser tratados pelos métodos da invenção são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Além disso, os especialistas na técnica vão reconhecer que os efeitos terapêuticos não precisam ser completos ou curativos, desde que proporcionem algum benefício ao indivíduo.

4. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As **Figs. 1A-1E** ilustram a expressão de CD19 por linhas de ratinhos hCD19TG. A **Fig. 1A** mostra a expressão de CD19 humano e de ratinho por células B de ratinhos hCD19TG (TG-1^{+/-}). A **Fig. 1B** mostra as densidades médias relativas da expressão de CD19 humano e de ratinho por células B sanguíneas CD19⁺ de ratinhos hCD19TG. A **Fig. 1C** mostra as densidades relativas da expressão de hCD19 e mCD19 por células B CD19⁺ de tecidos de ratinhos TG-1^{+/-}. A **Fig. 1D** mostra a densidade de ligação do anticorpo CDC19 em sangue de ratinho e células B B220⁺ de baço de ratinhos TG-1^{+/-}. A **Fig. 1E** mostra anticorpo anti-CD19 ligado a células 300.19 de hCD19 transfectadas com cADN.

As Figs. **2A-2D** mostram depleção de células B do sangue, baço, e nódulos linfáticos em ratinhos hCD19TG. A **Fig. 2A** demonstra depleção representativa de células B do sangue, baço, e nódulos linfáticos 7 dias após tratamento com anticorpo CD 19 ou controlo de isotipo correspondente (CTL) de ratinhos TG-1^{+/-}. A **Fig. 2B** mostra um período de tempo de depleção das células B circulantes por anticorpos anti-CD19. As **Fig. 2C** e **Fig. 2D** mostram os números de células B do baço e nódulos linfáticos (\pm SEM), respetivamente, após tratamento de ratinhos TG-1^{+/-} com anticorpo CD 19 (barras preenchidas) ou controlo (barras não preenchidas) às doses indicadas.

As **Figs. 3A-3F** ilustram a depleção de células B da medula óssea após tratamento com anticorpo anti-CD19. A **Fig. 3A** mostra a expressão representativa de hCD19 e mCD19 por subpopulações de células B na medula óssea de TG-1^{+/-} avaliadas por coloração de quatro cores com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. A **Fig. 3B** mostra a depleção de células hCD19⁺ na medula óssea de ratinhos hCD19TG sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 ou controlo de isotipo correspondente (250 μ g) avaliado por coloração de duas cores com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. A **Fig. 3C** mostra depleção representativa de células B B220⁺ na medula óssea sete dias após tratamento com anticorpo CD19 ou controlo de isotipo correspondente (250 μ g) de ratinhos TG-1^{+/-}. A **Fig. 3D** mostra depleção representativa de um subconjunto de células B sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 ou controlo de isotipo correspondente (250 μ g) de ratinhos TG-1^{+/-} como avaliado por coloração de três cores com imunofluorescência. As células pró-/pré- B IgM-B220¹⁰ foram ainda subdivididas com base na expressão de CD43 (painéis de baixo). A **Fig. 3E** mostra depleção representativa de

células pré-B CD25⁺a220^{lo} sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 ou controlo de isotipo correspondente (250 µg) das linhas de ratinhos hCD 19TG como avaliado por coloração de duas cores com imunofluorescência. A **Fig. 3F** mostra gráficos de barras indicando os números (\pm SEM) de células pró-B, pré-B, imaturas, e maduras B nos fêmures bilaterais sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 (barras preenchidas) ou controlo (barras não preenchidas) de ≥ 3 pares de animais da mesma ninhada.

As Figs. **4A-4C** demonstram que as células B da cavidade peritoneal são sensíveis ao tratamento com anticorpo anti-CD19. A **Fig. 4A** mostra a expressão de CD19 humano e de ratinho por células B CD5⁺B220⁺ B1a e CD5-B220^{hi} B2 (convencional) da cavidade peritoneal. A **Fig. 4B** mostra a depleção de células B220⁺ da cavidade peritoneal de ratinhos TG-1^{+/-} tratados com anticorpos CD19 (HB12a, HB12b, e FMC63 a 250 µg; B4 e HD237 a 50 µg) ou anticorpo de controlo (250 µg). A **Fig. 4C** mostra depleção representativa de células B CD5⁺B220⁺ B1a e CD5-B220^{hi} B2 sete dias após tratamento com anticorpos anti-CD19 ou de controlo de ratinhos hCD19TG.

A **Fig. 5A** ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:1) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:2) para sequências juncionais V_H-D-J_H da cadeia pesada do anticorpo anti-CD19 HB12a. A **Fig. 5B** ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:3) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:4) para sequências funcionais V_H-D-J_H da cadeia pesada do anticorpo anti-CD19 HB12b.

A **Fig. 6A** ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:15) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:16) para as sequências da cadeia leve de anticorpo anti-CD19 HB12a. A

Fig. 6B ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:17) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:18) para as sequências da cadeia leve do anticorpo anti-CD19 HB12b.

As Figs. **7A-7B** ilustram o alinhamento da sequência de aminoácidos dos anticorpos CD19 de ratinho anti-(humanos) publicados. A **Fig. 7A** mostra um alinhamento de sequência para as sequências juncionais de cadeia pesada V_H -D- J_H incluindo uma sequência de consenso (SEQ ID NO:5), HB12a (SEQ ID NO:2), 4G7 (SEQ ID NO:6), HB12b (SEQ ID NO:4), HD37 (SEQ ID NO:7), B43 (SEQ ID NO:8), e FMC63 (SEQ ID NO:9). A **Fig. 7B** mostra a análise da sequência de aminoácidos da cadeia leve V_k dos anticorpos anti-CD19. A sequência de consenso (SEQ ID NO:10), HB12a (SEQ ID NO:16), HB12b (SEQ ID NO:18), HD37 (SEQ ID NO:11), B43 (SEQ ID NO:12), FMC63 (SEQ ID NO:13), e 4G7 (SEQ ID NO:14) são alinhadas.

As **Figs. 8A-8C** demonstram que a densidade de CD 19 influencia a eficácia da depleção das células B por anticorpos anti-CD19 *in vivo*. A depleção representativa de células B sanguíneas e de baço em ratinhos hCD19TG são mostrados após tratamento com anticorpo HB12b (**Fig. 8A**) ou FMC63 (**Fig. 8B**) (sete dias, 250 μ g/ratinho). A **Fig. 8C** mostra as densidades relativas de ligação a anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 em células B B220⁺ sanguíneas de ratinhos TG-1^{+/-}. A **Fig. 8D** mostra as densidades relativas de ligação a anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 em células B B220⁺ de baço de ratinhos TG-1^{+/-}.

As **Figs. 9A-9D** demonstram que a depleção de células B após tratamento com anticorpo anti-CD19 é dependente de FcR γ e monócitos. **Fig. 9A** Depleção representativa de células B sanguíneas e de baço 7 dias após tratamento com anticorpo CD 19 ou isotipo de controlo de animais da mesma ninhada TG-1^{+/-} FcR γ ^{+/-} ou TG-1^{+/-} FcR γ ^{-/-} de hCD 19. **Fig. 9B**

Depleção de células B sanguíneas e de tecido sete dias após tratamento com anticorpo de animais da mesma ninhada FcRγ^{-/-} ao dia zero. **Fig. 9C** Números de células B representativos em ratinhos hCD19 TG-1^{+/-} depletados de monócitos. **Fig. 9D** Depleção de células B sanguíneas e de tecido sete dias após tratamento com anticorpo.

As **Figs. 10A-10D** demonstram a duração e resposta à dose da depleção de células B após tratamento com anticorpo anti-CD19. A **Fig. 10A** mostra os números de células B B220⁺ sanguíneas e células T Thy-1⁺ após tratamento com anticorpo FMC63 ou isotipo-controlo de ratinhos TG-1^{+/-} ao dia zero. As **Figs. 10B-C** mostram a depleção representativa de células B de tecido de ratinhos mostrados na **Fig. 10A** às 11, 16, e 30 semanas após tratamento com anticorpo, a **Fig. 10D** mostra respostas à dose de anticorpo anti-CD19 quanto à depleção das células B sanguíneas, de medula óssea, e de baço.

As **Figs. 11A-11C** demonstram que CD 19 não é internalizado após a ligação ao anticorpo *in vivo*. A expressão de CD19 à superfície da célula e a eliminação de células B em ratinhos TG-1^{+/-} tratados com HB12a (**Fig. 11A**), HB12b (**Fig. 11B**), FMC63 (**Fig. 11C**) ou o anticorpo de controlo com isotipo correspondente. (250 µg) *in vivo*.

As **Figs. 12A-12C** demonstram saturação de CDC19 após ligação de anticorpo anti-CD19 *in vivo*. A **Fig. 12A** mostra eliminação de células B em ratinhos TG-1^{+/-} tratados com anticorpo FMC63 ou de controlo de isotipo correspondente (250 µg) *in vivo*. A **Fig. 12B** mostra que o tratamento com anticorpo FMC63 (250 µg) satura os sítios de ligação a anticorpo em hCD 19 dentro de 1 hora de administração. A **Fig. 12C** mostra que o tratamento com anticorpo anti-CD19 HB12b (250 µg) satura os sítios de ligação a anticorpo em

hCD19 dentro de 1 hora de administração como avaliado na **Fig. 12B**.

As **Figs. 13A-13B** demonstram que o tratamento com anticorpos anti-CD19 reduz os níveis séricos de imunoglobulinas e de auto-anticorpos em ratinhos TG-1^{+/-}. A **Fig. 13A** ilustra os níveis de imunoglobulina sérica e a **Fig. 13B** os níveis de autoanticorpos anti-dsADN, anti-ssADN e anti-histona após tratamento com anticorpos anti-CD19.

As **Figs. 14A-14B** demonstram que o tratamento com anticorpo anti-CD19 bloqueia as respostas imunes humorais em ratinhos TG-1^{+/-}. Os ratinhos tratados com anticorpo foram imunizados com TNP-LPS **Fig. 14A**, DNP-Ficoll **Fig. 14B** e DNP-KLH **Figs. 14C-14D**. Animais da mesma ninhada foram tratados com anticorpo FMC63 (círculos fechados) ou de controlo (círculos abertos) (250 µg) (A-C) 7 dias antes ou: (D) 14 dias após imunizações primárias ao dia 0.

A **Fig. 15** demonstra que tratamentos simultâneos com anticorpos anti-CD19 e anti-CD20 são aditivos.

A **Fig. 16** demonstra que a administração subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e i.v. de anticorpo anti-CD19 depleta eficazmente as células B em circulação e em tecidos *in vivo*.

Fig. 17A-17B. Tratamento com anticorpo anti-CD19 previne o crescimento de linfoma hCD19⁺ *in vivo* (**Fig. 17A**) e aumenta a taxa de sobrevivência (**Fig. 17B**).

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se com composições imunoterapêuticas e anticorpos para uso em métodos para o tratamento de doenças

e distúrbios das células B em indivíduos humanos, tal como, mas não se limitando a, malignidades das células B, usando anticorpos terapêuticos que se ligam ao antígeno CD19 e que preferencialmente medeiam ADCC em humanos. A presente invenção relaciona-se com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 humanizados, ou quiméricos do isotipo humano IgG1 ou IgG3. A presente invenção também se relaciona com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 humanizados do isotipo humano IgG2 ou IgG4 que preferencialmente medeiam ADCC em humanos. Em certas formas de realização, a presente invenção também se relaciona com composições farmacêuticas compreendendo anticorpos anti-CD19 monoclonais humanizados, ou quimerizados que podem ser produzidas por meios conhecidos na técnica.

Formulações e regimes terapêuticos são descritos para tratar indivíduos humanos diagnosticados com malignidades das células B que derivam das células B e seus precursores, incluindo mas não se limitando a, leucemias linfoblásticas agudas (ALL), Linfomas de Hodgkin, linfoma não de Hodgkins, leucemias linfocíticas crônicas das células B (CLL), mieloma múltiplo, linfoma folicular, linfoma de células do manto, leucemias pró-linfocíticas, leucemia de células pilosas, leucemias linfocíticas agudas comuns e algumas Leucemias linfoblásticas agudas tipo Null.

5.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD 19

5.1.1. ANTICORPOS ANTI-CD19 POLICLONAIS

Anticorpos policlonais são preferencialmente produzidos em animais com múltiplas injeções subcutâneas (sc) ou intraperitoneais (i.p:) do antígeno relevante e um adjuvante. Pode ser útil conjugar o antígeno relevante a

uma proteína que seja imunogénica nas espécies a serem imunizadas, por exemplo, hemocianina da lapa buraco de fechadura, albumina sérica, tiroglobulina bovina, ou inibidor de tripsina de soja usando um agente bifuncional ou derivatizante, por exemplo, éster sulfosuccinimida de maleimidobertzoilo (conjugação através de resíduos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (através de resíduos de lisina), glutaraldeído, anidrido succínico, SOCl_2 .

Os animais são imunizados contra o antigénio, conjugados imunogénicos, ou derivados combinando, por exemplo, 100 µg ou 5 µg de proteína ou conjugado (para coelhos ou ratinhos, respetivamente) com 3 volumes de adjuvante completo de Freund's e injetando a solução intradermicamente em múltiplos sítios. Um mês depois os animais são reforçados com 1/5 a 1/10 da quantidade original de péptido ou conjugado em adjuvante incompleto de Freund's por injeção subcutânea em múltiplos sítios. Sete a 14 dias depois os animais são sangrados e o soro é analisado quanto ao título de anticorpos. Os animais são reforçados até o título atingir um *plateau*. Preferencialmente, o animal é reforçado com o conjugado do mesmo antigénio, mas conjugado a uma proteína diferente e/ou através de um reagente de ligação cruzada diferente. Os conjugados podem também ser feitos em cultura de células recombinantes como fusões de proteínas. Também, agentes agregantes tais como alúmen são adequadamente usados para melhorar a resposta imune.

5.12. ANTICORPOS ANTI-CD 19 MONOCLONAIS

Os anticorpos anti-CD19 monoclonais da invenção apresentam especificidade de ligação ao antigénio CD 19 humano e preferencialmente conseguem mediar ADCC em humanos. Estes anticorpos podem ser produzidos usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo o uso de

tecnologias de hibridoma, recombinante, e de apresentação de fago, ou uma combinação destes. Os anticorpos são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único sítio antigénico. Além disso, ao contrário de preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que tipicamente incluem anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epitopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antigénio CD 19 humano. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma descrito primeiro por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), que pode ser usado para gerar anticorpos de murino (ou anticorpos derivados de outros mamíferos não humanos, por exemplo, ratazana, cabra, ovelha, vacas, camelos, etc.), ou anticorpos humanos derivados de animais transgénicos (ver, Patentes U.S. Nos. 6,075,181, 6,114,598, 6,150,584, e 6,657,103). Alternativamente, os anticorpos monoclonais podem ser feitos por métodos de ADN recombinante (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 4,816,567) e incluem anticorpos quiméricos e humanizados. Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fagos usando as técnicas descritas em Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) e Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por exemplo.

Um anticorpo anti-CD19 modificado pode ser produzido por quaisquer meios conhecidos na técnica, incluindo, mas não se limitando a, aquelas técnicas descritas a seguir e melhorias nessas técnicas. Produção em grande escala e alto rendimento tipicamente envolve cultivar uma célula hospedeira que produz o anticorpo anti-CD19 modificado e recuperar o anticorpo anti-CD19 da cultura de células hospedeiras.

5.1.3. TÉCNICA DE HIBRIDOMA

Anticorpos monoclonais podem ser produzidos usando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas e ensinadas na técnica, por exemplo, em Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hatrimerling et al., em *Monoclonal Antibodies and T Cells Hybridomas*, 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Por exemplo, no método de hibridoma, um ratinho ou outro animal hospedeiro apropriado, tal como um hamster ou macacos macaque, é imunizado para induzir os linfócitos que produzem ou são capazes de produzir anticorpos que se vão ligar especificamente à proteína usada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados *in vitro*. Os linfócitos são depois fundidos com células de mieloma usando um agente de fusão adequado, tal como polietileno glicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

As células de hibridoma preparadas deste modo são semeadas e crescidas num meio de cultura adequado que preferencialmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células de mieloma parentais não tiverem a enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas vai tipicamente incluir hipoxantina, aminopterina, e timidina (meio HAT), substâncias essas que previnem o crescimento de células deficientes em HGPRT.

Células de mieloma preferidas são aquelas que se fundem eficazmente, ajudam a produção de alto nível estável de anticorpos pelas células produtoras de anticorpos selecionadas, e são sensíveis a um meio tal como meio HAT.

Estre estas, linhas de células de mieloma preferidas são linhas de mieloma de murino, tal como aquelas derivadas de tumores de ratinho MOPC-21 e MPC-11 disponíveis de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, EUA, e células SP-2 ou X63-Ag8.653 disponíveis de American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA. Linhas de células de mieloma humano e de heteromieloma de ratinho-humano foram também descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987)).

O meio de cultura em que as células de hibridoma são crescidas é analisado para a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno CD 19 humano. Preferencialmente, a especificidade de ligação dos anticorpos monoclonais produzidos pelas células de hibridoma é determinada por imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação *in vitro*, tal como radioimunoensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

Depois das células de hibridoma serem identificadas que produzem anticorpos da especificidade, afinidade, e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e crescidos por métodos padrão (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Meios de cultura adequados para este fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI 1640. Adicionalmente, as células de hibridoma podem ser crescidas *in vivo* como tumores de ascite num animal.

Os anticorpos monoclonais secretados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido de

ascite, ou soro por procedimentos de purificação de imunoglobulinas convencionais tal como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatite, eletroforese de gel, diálise, ou cromatografia de afinidade.

5.1.4. TÉCNICAS DE ADN RECOMBINANTE

ADN codificando os anticorpos anti-CD19 da invenção é facilmente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas de oligonucleótidos que são capazes de se ligar especificamente a genes codificando as cadeias pesadas e leves dos anticorpos anti-CD19). As células de hibridoma servem como fonte preferida desse ADN. Uma vez isolado, o ADN pode ser colocado em vetores de expressão, que são depois transfetados para células hospedeiras tais como células de *E. coli*, células COS de símio, células de ovário de hamster Chinês (CHO), ou células de mieloma que de outro modo não produzem proteína de imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos anti-CD19 nas células hospedeiras recombinantes.

Nos métodos de apresentação de fago, domínios de anticorpos funcionais são apresentados à superfície de partículas de fagos que possuem as sequências de polinucleótidos que os codificam. Em particular, em sequências de ADN codificando os domínios V_H e V_L são amplificadas a partir de bibliotecas de cADN animal (por exemplo, bibliotecas de cADN humano ou de murino de tecidos afetados). O cADN codificando os domínios V_H e V_L são recombinados conjuntamente com um ligante scFv por PCR e clonados num vetor fagomídeo. O vetor é eletroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infetada com fago helper. Os fagos usados nestes métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo fd e

M13 e os domínios V_H e V_L são normalmente fundidos recombinantemente ao gene III ou gene VIII de fago. O fago que expressa um domínio de ligação a antigénio que se liga a um antigénio específico pode ser selecionado ou identificado com antigénio, por exemplo, usando antigénio marcado ou antigénio ligado ou capturado numa superfície sólida ou esfera. Exemplos de métodos de apresentação de fagos que podem ser usados para fazer os anticorpos da presente invenção incluem aqueles divulgados em Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods, 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol., 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene, 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology, 57:191-280; Pedido Internacional No. PCT/GB91/01134; Publicações Internacionais Nos. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, e WO97/13844; e Patentes U.S. Nos. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743, e 5,969,108.

Como descrito nas referências acima, após seleção do fago, o anticorpo codificando regiões do fago pode ser isolado e usado para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação a antigénio desejado, e expresso em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células de mamífero, células de inseto, células de planta, levedura, e bactéria, por exemplo, como descrito a seguir. Técnicas para produzir fragmentos de Fab, Fab' e $F(ab')_2$ recombinantemente podem também ser empregues usando métodos conhecidos na técnica tal como aqueles divulgados na Publicação PCT No. WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, BioTechniques, 12(6):864-869; Sawai et al., 1995, AJRI, 34:26-34; e Better et al., 1988, Science, 240:1041-1043.

Os anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fagos de anticorpos geradas usando as técnicas descritas em McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991). Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) descrevem o isolamento de anticorpos de murino e humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Rearranjo de cadeia pode ser usado na produção de anticorpos humanos de alta afinidade (gama de nM) (Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), assim como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como uma estratégia para construir bibliotecas de fagos muito grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Assim, estas técnicas são alternativas viáveis a técnicas de hibridoma de anticorpos monoclonais tradicionais para isolamento de anticorpos anti-CD19.

Para gerar anticorpos inteiros, primers de PCR incluindo sequências de nucleótidos de V_H ou V_L , um sítio de restrição, e uma sequência flanqueadora para proteger o sítio de restrição podem ser usados para amplificar as sequências de V_H ou V_L em clones de scFv. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas do especialista na técnica, os domínios V_H amplificados por PCR podem ser clonados em vetores expressando uma região V_H constante, por exemplo, a região constante humana gama 4, e os domínios V_L amplificados por PCR podem ser clonados em vetores expressando uma região V_L constante, por exemplo, regiões constantes humanas kapa ou lambda. Preferencialmente, os vetores para expressar os domínios V_H ou V_L compreendem um promotor EF-1 α , um sinal de secreção, um sítio de clonagem para o domínio variável, domínios constantes, e um marcador de seleção tal como neomicina. Os domínios V_H e V_L podem também ser clonados num vetor expressando as necessárias regiões constantes. Os vetores de conversão da cadeia pesada e os vetores de conversão da cadeia leve são depois

co-transfetados para linhas celulares para gerar linhas celulares estáveis ou temporárias que expressam anticorpos de comprimento total, por exemplo, IgG, usando técnicas conhecidas dos especialistas na técnica.

O ADN pode também ser modificado, por exemplo, substituindo aa sequência codificantes para os domínios constantes das cadeias pesadas e leves humanas no lugar das sequências homólogas de murino (Patente U.S. No. 4,81,6,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81:6851 (1984)), ou juntando covalentemente à sequência codificante de imunoglobulina toda ou parte da sequência codificante de um polipéptido não-imunoglobulina.

5.1.5. ANTICORPOS QUIMÉRICOS

Os anticorpos anti-CD19 aqui incluem especificamente anticorpos quiméricos (imunoglobulinas) nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie específica ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpos específicas, enquanto outra porção da(s) cadeia(s) é idêntica ou homóloga a sequências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpos, assim como fragmentos desses anticorpos, desde que apresentem a desejada atividade biológica (Patente U.S. No. 4,816,567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 81:68,51-6855 (1984)). Anticorpos quiméricos de interesse aqui incluem anticorpos "primatizados" compreendendo sequências de ligação a antigénio de domínio variável derivadas de um primata não humano (por exemplo, Macaco do Velho Mundo, tal como babuíno, macaco Rhesus ou cinomolgos) e sequências da região constante humana (Patente U.S. No. 5,693,780).

5.1.6. ANTICORPOS HUMANIZADOS

Um anticorpo humanizado pode ser produzido usando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo mas não se limitando a, enxerto de CDR (ver, por exemplo, Patente Europeia No. EP 239, 400; Publicação Internacional No. WO 91/09967; e Patentes U.S. Nos. 5,225,539, 5,530,101, e 5,585,089), "veneering" ou "resurfacing" (ver, por exemplo, Patente Europeia Nos. EP 592,106 e EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering, 7(6):805-814; e Roguska et al., 1994, PNAS, 91:969-973), rearranjo de cadeia (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5,565,332), e técnicas divulgadas, por exemplo, na Patente U.S. No. 6,407,213, Patente U.S. No. 5,766,886, Publicação Internacional No. WO 9317105, Tan et al., J. Immunol., 169:1119-25 (2002), Caldas et al., Protein Eng., 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods, 20(3):267-79 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng., 9(10):895-904 (1996), Couto et al., Cancer Res., 55 (23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene, 150(2):409-10 (1994), e Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994). Frequentemente, os resíduos de estrutura nas regiões de estrutura vão ser substituídos com o resíduo correspondente do anticorpo dador de CDR para alterar, preferencialmente melhorar, a ligação ao antígeno. Estas substituições de estrutura são identificadas por métodos bem conhecidos na técnica, por exemplo, modelando as interações das CDR e resíduos de estrutura para identificar resíduos de estrutura importantes para ligação ao antígeno e comparação de sequência para identificar resíduos de estrutura invulgares em posições específicas. (Ver, por exemplo, Queen et al.,

Patente U.S. No. 5,585,089; e Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323.)

Um anticorpo anti-CD19 humanizado tem um ou mais resíduos de aminoácidos nele introduzidos de uma fonte que é não humana. Estes resíduos de aminoácidos não humanos são frequentemente referidos como resíduos "importados", que são tipicamente tirados de um domínio variável de "importação". Assim, anticorpos humanizados compreendem uma ou mais CDRs de moléculas de imunoglobulina não humanas e regiões de estrutura de humanos. A humanização dos anticorpos é bem conhecida na técnica e pode ser essencialmente realizada seguindo o método de Winter e colegas (Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)), substituindo CDRs de roedores ou sequências de CDR pelas sequências correspondentes de um anticorpo humano, isto é, enxerto de CDR (EP 239,400; Publicação PCT No. WO 91/09967; e Patentes U.S. Nos. 4,816,567; 6,331,415; 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 6,548,640), Nesses anticorpos quiméricos humanizados, substancialmente menos que um domínio variável humano intacto foi substituído pela sequência correspondente de uma espécie não humana. Em termos práticos, anticorpos humanizados são tipicamente anticorpos humanos nos quais alguns resíduos de CDR e possivelmente alguns resíduos de FR são substituídos por resíduos de sítios análogos em anticorpos de roedores. A humanização de anticorpos anti-CD19 pode também ser conseguida por "veneering" ou "resurfacing" (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., Protein Engineering, 7(6):805-814 (1994); e Roguska et al., PNAS, 91:969-973 (1994)) ou rearranjo de cadeia (Patente U.S. No. 5,565,332).

A escolha de domínios variáveis humanos, leves e pesados, a serem usados na produção de anticorpos humanizados é para reduzir antigenicidade. De acordo com o chamado método "de melhor ajuste", a sequência do domínio variável de um anticorpo de roedor é analisada contra a biblioteca inteira de sequências de domínios variáveis conhecidos humanos. A sequência humana que é mais próxima da de roedor é depois aceite como estrutura humana (FR) para o anticorpo humanizado (Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Outro método usa uma estrutura específica derivada da sequência de consenso de todos os anticorpos humanos de um subgrupo específico das cadeias leves ou pesadas. A mesma estrutura pode ser usada para vários anticorpos anti-CD19 humanizados diferentes (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Anticorpos anti-CD19 podem ser humanizados com retenção de alta afinidade para CD 19 e outras propriedades biológicas favoráveis. Os anticorpos humanizados podem ser preparados por um processo de análise das sequências parentais e vários produtos humanizados conceituais usando modelos tridimensionais das sequências parentais e humanizadas. Modelos de imunoglobulinas tridimensionais estão normalmente disponíveis e são familiares dos especialistas na técnica. Estão disponíveis programas de computador que ilustram e apresentam estruturas prováveis de conformação tridimensional de sequências de imunoglobulinas candidatas selecionadas. A inspeção destas apresentações permite analisar o papel provável dos resíduos no funcionamento da sequência de imunoglobulina candidata, isto é, a análise dos resíduos que influenciam a capacidade da imunoglobulina candidata de se ligar a CD19. Deste modo, os resíduos de FR podem ser selecionados e combinados a partir das sequências

recetoras e de importação de modo a que a característica desejada do anticorpo, tal como afinidade aumentada para CD19, seja conseguida. Em geral, os resíduos de CDR são diretamente e mais substancialmente envolvidos na influência da ligação ao antígeno.

Um anticorpo "humanizado" retém uma especificidade antigénica semelhante à do anticorpo original, isto é, na presente invenção, a capacidade de ligação ao antígeno CD 19 humano. No entanto, usando certos métodos de humanização, a afinidade e/ou especificidade de ligação ao anticorpo para o antígeno CD19 humano pode aumentar usando métodos de "evolução direcionada," como descrito por Wu et al., J. Mol. Biol., 294:151 (1999).

5.1.7. ANTICORPOS HUMANOS

Para uso *in vivo* de anticorpos em humanos, pode ser preferível usar anticorpos humanos. Anticorpos completamente humanos são particularmente desejáveis para tratamento terapêutico de indivíduos humanos. Anticorpos humanos podem ser feitos por uma variedade de métodos conhecidos na técnica incluindo métodos de apresentação de fagos descritos acima usando bibliotecas de anticorpos derivadas de sequências de imunoglobulinas humanas, incluindo melhorias nestas técnicas. Ver, também, Patentes U.S. Nos. 4,444,887 e 4,716,111; e publicações PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, e WO 91/10741. Um anticorpo humano pode também ser um anticorpo em que as cadeias pesadas e leves são codificadas por uma sequência de nucleótidos derivada de uma ou mais fontes de ADN humano.

Anticorpos anti-CD19 humanos podem também ser produzidos usando ratinhos transgênicos que são incapazes de expressar

imunoglobulinas funcionais endógenas, mas que podem expressar genes de imunoglobulinas humanas. Por exemplo, os complexos de genes de imunoglobulinas humanas de cadeia pesada e leve podem ser introduzidos aleatoriamente ou por recombinação homóloga em células estaminais embriônicas de ratinho. Alternativamente, a região variável humana, região constante, e região de diversidade podem ser introduzidas em células estaminais embriônicas de ratinho para além dos genes das cadeias pesadas e leves humanas. Os genes de imunoglobulina de cadeia pesada e leve de ratinho podem ser tornados não funcionais separadamente ou simultaneamente com a introdução de locais de imunoglobulinas humanas por recombinação homóloga. Por exemplo, foi descrito que a deleção homozigótica do gene da região de junção (JH) da cadeia pesada do anticorpo em ratinhos mutantes quiméricos e de linha germinativa resulta na inibição completa da produção endógena de anticorpos. As células estaminais embriônicas modificadas são expandidas e microinjetadas em blastocistos para produzir ratinhos quiméricos. Os ratinhos quiméricos são depois reproduzidos para produzir descendência homozigótica que expressa anticorpos humanos. Os ratinhos transgênicos são imunizados de forma normal com um antígeno selecionado, por exemplo, todo ou uma porção de um polipéptido da invenção. Anticorpos anti-CD19 direcionados contra o antígeno CD 19 humano podem ser obtidos a partir de ratinhos imunizados transgênicos usando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humanos transportados nos ratinhos transgênicos rearranjam-se durante a diferenciação das células B, e subsequentemente sofrem mudança de classe e mutação somática. Assim, usando essa técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis, incluindo, mas não se limitando a, IgG1 (gama 1) e IgG3. Para uma visão geral desta tecnologia para produzir anticorpos humanos, ver, Lonberg e Huszar (Int. Rev.

Immunol., 13:65-93 (1995)). Para uma discussão detalhada desta tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para produzir esses anticorpos, ver, por exemplo, Publicações PCT Nos. WO 98/24893, WO 96/34096, e WO 96/33735; e Patentes U.S. Nos. 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; e 5,939,598. Adicionalmente, empresas como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) e Genpharm (San Jose, CA) podem ser contratadas para fornecer anticorpos humanos direcionados contra um antígeno selecionado usando tecnologia semelhante à descrita acima. Para uma discussão específica da transferência de um arranjo de genes de imunoglobulina de linha germinal humana em linhas germinais de ratinhos mutantes que vai resultar na produção de anticorpos humanos após desafio de antígeno ver, por exemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7:33 (1993); e Duchosal et al., Nature, 355:258 (1992).

Anticorpos humanos podem também ser derivados de bibliotecas de apresentação de fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al., Nature Biotech., 14:309 (1996)). Tecnologia de apresentação de fago (McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) pode ser usada para produzir anticorpos humanos e fragmentos de anticorpo *in vitro*, a partir de repertórios de genes de domínios variáveis (V) de imunoglobulinas de dadores não imunizados. De acordo com esta técnica, genes do domínio V do anticorpo são clonados na estrutura num gene de proteína de revestimento maior ou menor de um bacteriófago filamentosos, tal como M13 ou fd, e apresentado como fragmentos funcionais de anticorpo à superfície da partícula de fago.

Pelo facto de a partícula filamentosa conter uma cópia de ADN de cadeia simples do genoma do fago, seleções baseadas nas propriedades funcionais do anticorpo também resultam na seleção do gene que codifica o anticorpo que exhibe estas propriedades. Assim, o fago imita algumas das propriedades das células B. A apresentação de fago pode ser realizada numa variedade de formatos; para uma revisão destes ver, por exemplo, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Várias fontes de segmentos de gene V podem ser usadas para apresentação de fagos. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) isolaram um arranjo diverso de anticorpos anti-oxazolone a partir de uma pequena biblioteca combinatória aleatória de genes V derivados dos baços de ratinhos não imunizados. Um repertório de genes V de dadores humanos não imunizados pode ser construído e anticorpos para um arranjo diverso de antigénios (incluindo auto-antigénios) podem ser isolados essencialmente seguindo as técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), ou Griffith et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). Ver, também, Patentes U.S. Nos. 5,565,332 e 5,573,905.

Anticorpos humanos podem também ser gerados por células B ativadas *in vitro* (ver, Patentes U.S. 5,567,610 e 5,229,275). Anticorpos humanos podem também ser gerados *in vitro* usando técnicas de hibridoma tais como, mas não se limitando a, aquela descrita por Roder et al. (*Methods Enzymol.*, 121:140-167 (1986)).

5.1.8. ANTICORPOS ALTERADOS/MUTANTES

Os anticorpos anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser anticorpos mutantes. Como aqui usado, "anticorpo mutante" ou "anticorpo alterado"

refere-se a uma variante da sequência de aminoácidos de um anticorpo anti-CD19 em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos de um anticorpo anti-CD19 foram modificados. As modificações na sequência de aminoácidos do anticorpo anti-CD19, incluem modificações na sequência para melhorar a afinidade ou avidéz do anticorpo para o seu antigénio, e/ou modificações na porção Fc do anticorpo para melhorar a função efetora. As modificações podem ser feitas por quaisquer anticorpos anti-CD19 conhecidos ou anticorpos anti-CD19 identificados como aqui descrito. Esses anticorpos alterados têm necessariamente menos de 100% de identidade de sequência ou semelhança com um anticorpo anti-CD19 conhecido. O anticorpo alterado pode ter uma sequência de aminoácidos com pelo menos 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, ou 75% de identidade ou semelhança da sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-CD19, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e o mais preferencialmente pelo menos 95%. O anticorpo alterado pode ter uma sequência de aminoácidos com pelo menos 25%, 35%, 45%, 55%, 65%, ou 75% de identidade ou semelhança de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos da cadeia pesada CDR1, CDR2, ou CDR3 de um anticorpo anti-CD19, mais preferencialmente pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 85%, mais preferencialmente pelo menos 90%, e o mais preferencialmente pelo menos 95%. Numa forma de realização preferida, o anticorpo alterado vai manter a capacidade de ligação ao CD 19 humano. O anticorpo anti-CD19 da invenção pode compreender uma cadeia pesada que é cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (**Fig. 5A**) correspondendo à cadeia pesada de HB12a. O anticorpo anti-CD19 da invenção

pode compreender uma cadeia pesada que é cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4 (**Fig. 5B**) correspondendo à cadeia pesada de HB12b. O anticorpo anti-CD19 da invenção pode compreender a cadeia leve que é cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16 (**Fig. 6A**) correspondendo a uma cadeia leve de HB12a. O anticorpo anti-CD19 da invenção pode compreender uma cadeia leve que é cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18 (**Fig. 6B**) correspondendo a uma cadeia leve de HB12b. Hibridomas produzindo anticorpos anti-CD19 HB 12a e HB 12b foram depositados sob os depósitos ATCC nos. PTA-6580 e PTA-6581.

Identidade ou semelhança no que respeita a esta sequência é aqui definido como a percentagem de resíduos de aminoácidos na sequência candidata que é idêntica (isto é, o mesmo resíduo) ou semelhante (isto é, resíduos de aminoácidos do mesmo grupo com base nas propriedades das cadeias laterais comuns, ver a seguir) com os resíduos do anticorpo anti-CD19, após alinhamento das sequências e introdução de espaços, se necessário, para conseguir a percentagem máxima de identidade de sequência. Nenhuma das extensões, deleções, ou inserções N-terminais, C-terminais, ou internas na sequência do anticorpo fora do domínio variável deve ser construída de modo a afetar a identidade ou semelhança de sequência.

"% de identidade," como conhecido na técnica, é uma medida da relação entre dois polinucleótidos ou dois polipéptidos,

como determinado comparando as suas sequências. Em geral, as duas sequências a serem comparadas são alinhadas para dar uma correlação máxima entre as sequências. O alinhamento das duas sequências é examinado e o número de posições que dá uma correspondência exata de aminoácidos ou nucleótidos entre as duas sequências é determinado, dividido pelo comprimento total do alinhamento e multiplicado por 100 para dar um número de % de identidade. Este número de % de identidade pode ser determinado sobre o comprimento total das sequências a serem comparadas, o que é particularmente adequado para sequências do mesmo comprimento ou de comprimento muito semelhante e que são altamente homólogas, ou sobre comprimentos definidos mais curtos, o que é mais adequado para sequências com diferentes comprimentos ou que têm um nível menor de homologia.

Por exemplo, as sequências podem ser alinhadas com o software "clustalw" em Unix que gera um ficheiro com uma extensão ".aln", este ficheiro pode depois ser importado para o programa Bioedit (Hall, T.A. 1999, BioEdit: user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98) que abre o ficheiro .aln. Na janela do Bioedit, pode-se escolher sequências individuais (duas de cada vez) e alinhá-las. Este método permite a comparação da sequência inteira.

Métodos para comparar a identidade de duas ou mais sequências são bem conhecidos na técnica. Assim por exemplo, há programas disponíveis no Pacote de Análise de Sequências da Wisconsin, versão 9.1 (Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984, disponível de Genetics Computer Group, Madison, WI, EUA). A determinação da percentagem de identidade entre as duas sequências pode ser conseguida usando um algoritmo matemático. Por exemplo,

os programas BESTFIT e GAP, podem ser usados para determinar a % de identidade entre as duas sequências de polinucleótidos e a % de identidade entre os dois polipéptidos. BESTFIT usa o algoritmo de "homologia local" de Smith e Waterman (Advances in Applied Mathematics, 2:482-489, 1981) e encontra a melhor região simples de semelhança entre duas sequências. BESTFIT é mais adequado para comparar duas sequências de polinucleótidos ou dois polipéptidos que são diferentes em comprimento, em que o programa assume que a sequência mais curta representa uma porção da mais longa. Em comparação, GAP alinha duas sequências encontrando a "semelhança máxima" de acordo com o algoritmo de Neddleman e Wunsch (J. Mol. Biol., 48:443-354, 1970). GAP é mais adequado para comparar sequências que têm aproximadamente o mesmo comprimento e é esperado um alinhamento ao longo do comprimento total. Preferencialmente os parâmetros "Gap Weight" e "Length Weight" usados em cada programa são 50 e 3 para polinucleótidos e 12 e 4 para polipéptidos, respectivamente. Preferencialmente % de identidades e semelhanças são determinadas quando as duas sequências a serem comparadas são alinhadas otimamente.

Outros programas para determinar a identidade e/ou semelhança entre sequências são também conhecidos na técnica, por exemplo a família de programas BLAST (Karlin & Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, modificado como em Karlin & Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877, disponível do National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda; MD, EUA e acessível através da página inicial do NCBI em www.ncbi.nlm.nih.gov). Estes programas exemplificam um exemplo preferido, não limitante de um algoritmo matemático utilizado para comparação de duas sequências. Esse algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de

Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410. Pesquisas de nucleótidos BLAST podem ser realizadas com o programa NBLAST, valor = 100, comprimento de palavra = 12 para obter sequências de nucleótidos homólogas a uma molécula de ácido nucleico codificando toda ou uma porção de um anticorpo anti-CD19 da invenção. Pesquisas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa XBLAST, valor = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas a uma molécula de proteína da invenção. Para obter alinhamentos com espaços para fins de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402. Alternativamente, PSI-Blast pode ser usado para realizar pesquisa iterada que deteta relações distantes entre moléculas (*Id.*). Quando se utiliza os programas BLAST, Gapped BLAST, e PSI-Blast, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, XBLAST e NBLAST) podem ser usados. Ver, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Outro exemplo preferido, não limitante de um algoritmo matemático utilizado para comparação de sequências é o algoritmo de Myers e Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Esse algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) que faz parte do pacote de *software* de alinhamento de sequências GCG. Quando se utiliza o programa ALIGN para comparar sequências de aminoácidos, uma tabela de pesos de resíduos PAM120, uma penalização de comprimento de espaço de 12, e uma penalização de espaço de 4 podem ser usadas.

Outro exemplo não limitante de um programa para determinar identidade e/ou semelhança entre sequências conhecido na técnica é FASTA (Pearson W.R. e Lipman D.J., Proc. Nat. Acad. Sci. EUA, 85:2444-2448, 1988, disponível como parte do Pacote de Análise de Sequências da Wisconsin). Preferencialmente a matriz de substituição de aminoácidos BLOSUM62 (Henikoff S. e Henikoff J.G., Proc. Nat. Acad.

Sci. USA, 89:10915-10919, 1992) é usada em comparações com sequências de polipéptidos incluindo quando sequências de nucleótidos são primeiro traduzidas para sequências de aminoácidos antes da comparação.

Ainda outro exemplo não limitante de um programa conhecido na técnica para determinar a identidade e/ou semelhança entre sequências de aminoácidos é o *Software SeqWeb* (uma interface baseada na web para o Pacote GCG Wisconsin: programa Gap) que é utilizado com o algoritmo padrão e definições dos parâmetros do programa: *blosum62*, *gap weight 8*, *length weight 2*.

A percentagem de identidade entre duas sequências pode ser determinada usando técnicas semelhantes às descritas acima, permitindo ou não espaços. No cálculo da percentagem de identidade, tipicamente são contadas as correspondências exatas.

Preferencialmente o programa *BESTFIT* é usado para determinar a % de identidade de um polinucleótido em questão ou uma sequência de polipéptidos no que respeita a uma sequência de polinucleótidos ou de polipéptidos da presente invenção, a sequência em questão e a sequência de referência são alinhadas otimamente e os parâmetros do programa definidos como os valores padrão.

Para gerar um anticorpo alterado, uma ou mais alterações de aminoácidos (por exemplo, substituições) são introduzidas numa ou mais das regiões hipervariáveis do anticorpo dependente da espécie. Alternativamente, ou adicionalmente, uma ou mais alterações (por exemplo, substituições) dos resíduos da região de estrutura podem ser introduzidas num anticorpo anti-CD19 quando estas resultam numa melhoria na afinidade de ligação do anticorpo mutante para o antigénio

da segunda espécie de mamífero. Exemplos de resíduos da região de estrutura para modificar incluem aqueles que se ligam de forma não covalente ao antígeno diretamente (Amit et al., *Science*, 233:747-753 (1986)); interagem com/afetam a conformação de uma CDR (Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)); e/ou participam na interface V_L - V_H (EP 239 400B1). Em certas formas de realização, a modificação de um ou mais destes resíduos da região de estrutura resulta numa melhoria da afinidade de ligação do anticorpo para o antígeno de uma segunda espécie de mamífero. Por exemplo, desde cerca de um até cerca de cinco resíduos de estrutura podem ser alterados nesta forma de realização da invenção. Por vezes, isto pode ser suficiente para produzir um anticorpo mutante adequado para uso em ensaios pré-clínicos, mesmo quando nenhum dos resíduos da região hipervariável foi alterado. Normalmente, no entanto, um anticorpo alterado vai compreender alteração(ões) adicionais da região hipervariável.

Os resíduos da região hipervariável que são alterados podem ser alterados aleatoriamente, especialmente quando a afinidade de ligação inicial de um anticorpo anti-CD19 para o antígeno de uma segunda espécie de mamífero é tal que esse anticorpo alterado produzido aleatoriamente pode ser facilmente analisado.

Um procedimento útil para gerar esse anticorpo alterado é chamado "mutagénese de análise de alanina" (Cunningham e Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)). Aqui, um ou mais dos resíduos da região hipervariável são substituídos por resíduos de alanina ou polialanina para afetar a interação dos aminoácidos com o antígeno da segunda espécie de mamífero. Esses resíduos da região hipervariável que apresentam sensibilidade funcional às substituições são depois refinados por introdução de mutações adicionais ou

outras nos ou para os sítios das substituições. Assim, enquanto o sítio para introduzir uma variação da sequência de aminoácidos é pré-determinado, a natureza da mutação por se não precisa de ser pré-determinada. Os mutantes de Ala produzidos deste modo são analisados quanto à sua atividade biológica como aqui descrito.

Outro procedimento para gerar esses anticorpos alterados envolve maturação da afinidade usando apresentação de fago (Hawkins et al., J. Mol. Biol., 254:889-896 (1992) e Lowman et al., Biochemistry, 30(45):10832-10837 (1991)). Resumidamente, vários sítios da região hipervariável (por exemplo, 6-7 sítios) são mutados para gerar todas as substituições de aminoácidos possíveis em cada sítio. Os anticorpos mutantes gerados deste modo são apresentados de uma forma monovalente a partir das partículas filamentosas do fago como fusões para o produto de gene III de M 13 empacotado dentro de cada partícula. Os mutantes apresentados por fagos são depois analisados quanto à sua atividade biológica (por exemplo, afinidade de ligação) como aqui divulgado.

Mutações nas sequências do anticorpo podem incluir substituições, deleções, incluindo deleções internas, adições, incluindo adições produzindo proteínas de fusão, ou substituições conservativas de resíduos de aminoácidos dentro da e/ou adjacente à sequência de aminoácidos, mas que resultam numa alteração "silenciosa", em que a alteração produz um anticorpo anti-CD19 funcionalmente equivalente. Substituições de aminoácidos conservativas podem ser feitas com base na semelhança na polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliidade, e/ou a natureza anfipática dos resíduos envolvidos. Por exemplo, aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina; valina, prolina, fenilalanina,

triptofano, e metionina; aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, e glutamina; aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina, e histidina; e aminoácidos carregados negativamente (acídicos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Adicionalmente, glicina e prolina são resíduos que podem influenciar a orientação da cadeia. Substituições não conservativas vão implicar trocar um membro de uma destas classes por outra classe. Além disso, se desejado, aminoácidos não clássicos ou análogos de aminoácidos químicos podem ser introduzidos como uma substituição ou adição na sequência do anticorpo. Aminoácidos não clássicos incluem, mas não se limitam a, os D-isômeros dos aminoácidos comuns, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiônico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos *designer* tal como β -metil aminoácidos, $\text{C}\alpha$ -metil aminoácidos, $\text{N}\alpha$ -metil aminoácidos, e aminoácidos análogos em geral.

Os sítios selecionados para modificação podem ter afinidade maturada usando apresentação de fago (ver acima).

Qualquer técnica de mutagénese conhecida na técnica pode ser usada para modificar nucleótidos individuais numa sequência de ADN, para fins de produzir substituição(ões) de aminoácidos na sequência do anticorpo, ou para criar/deletar sítios de restrição para facilitar outras manipulações. Essas técnicas incluem, mas não estão limitadas a, mutagénese química, mutagénese *in vitro*

direcionada para o sítio (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985); Hutchinson, C. et al., J. Biol. Chem., 253:6551 (1978)), mutagénese direcionada para o oligonucleótido (Smith, Ann. Rev. Genet., 19:423-463 (1985); Hill et al., Methods Enzymol., 155:558-568 (1987)), extensão de sobreposição baseada em PCR (Ho et al., Gene, 77:51-59 (1989)), mutagénese de megaprimer baseada em PCR (Sarkar et al., Biotechniques, 8:404-407 (1990)), etc. As modificações podem ser confirmadas por sequenciação de ADN didesoxi de cadeia dupla.

Em certas formas de realização da invenção os anticorpos anti-CD19 podem ser modificados para produzir proteínas de fusão; isto é, o anticorpo, ou um fragmento fundido com uma proteína heteróloga, polipéptido ou péptido. A proteína fundida com a porção de um anticorpo anti-CD19 pode ser um componente de enzima de ADEPT. Exemplos de outras proteínas ou polipéptidos que podem ser modificadas como uma proteína de fusão com um anticorpo anti-CD19 incluem, mas não se limitam a toxinas tais como ricina, abrina, ribonuclease, DNase I, enterotoxina-A Stafilococal, proteína antiviral de *Phytolacca americana*, gelonina, toxina difterina, exotoxina de *Pseudomonas*, e endotoxina de *Pseudomonas*. Ver, por exemplo, Pastan et al., Cell, 47:641 (1986), e Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994). Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usados incluem cadeia A de difteria, fragmentos ativos não ligantes da toxina da difteria, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A da ricina, cadeia A da abrina, cadeia A da modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina,

restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Ver, por exemplo, WO 93/21232 publicada a 28 de outubro, 1993.

Proteínas de fusão adicionais podem ser geradas através de técnicas de rearranjo de genes, rearranjo de motivos, rearranjo de exões, e/ou rearranjo de codões (coletivamente, referidos como "rearranjos de ADN"). Rearranjo de ADN pode ser empregue para alterar as atividades de SYNAGIS® ou fragmentos deste (por exemplo, um anticorpo ou um fragmento deste com maiores afinidades e menores taxas de dissociação). Ver, geralmente, Patentes U.S. Nos. 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; e 5,837,458, e Patten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol., 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J Mol. Biol., 287:265-76; e Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-313. O anticorpo pode ser uma proteína de fusão de imunoglobulina de domínio ligante como descrito na Publicação U.S. 20030118592, Publicação U.S. 200330133939, e Publicação PCT WO 02/056910, todas de Ledbetter et al.

5.1.9. ANTICORPOS DE DOMÍNIO

Os anticorpos anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser anticorpos de domínio, por exemplo, anticorpos contendo as pequenas unidades de ligação funcionais dos anticorpos, correspondendo às regiões variáveis das cadeias pesadas (V_H) ou leves (V_L) de anticorpos humanos. Exemplos de anticorpos de domínio incluem, mas não se limitam a, aqueles disponíveis de Domantis Limited (Cambridge, Reino Unido) e Domantis Inc. (Cambridge, MA, EUA) que são específicos para objetivos terapêuticos (ver, por exemplo, W004/058821; W004/003019;

Patentes U.S. Nos. 6,291,158; 6,582,915; 6,696,245; e 6,593,081). Bibliotecas de anticorpos de domínio disponíveis comercialmente podem ser usadas para identificar anticorpos de domínio anti-CD19. Os anticorpos anti-CD19 da invenção podem compreender uma unidade de ligação funcional de CD19 e uma unidade de ligação funcional do recetor gama de Fc.

5.1.10 DIACORPOS

O termo "diacorpos" refere-se a pequenos fragmentos de anticorpo com dois sítios de ligação a antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável da cadeia pesada (V_H) ligado a um domínio variável da cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica (V_H - V_L). Usando um ligante que é demasiado pequeno para permitir o emparelhamento entre os dois domínios da mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares da outra cadeia e criar dois sítios de ligação a antígeno. Diacorpos são descritos mais completamente em, por exemplo, EP 404,097; WO 93/11161; e Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

- 5.1.11. VACICORPOS

Os anticorpos anti-CD19 podem ser Vacicorpos. Vacicorpos são polipéptidos diméricos. Cada monómero de um vacicorpo consiste num scFv com especificidade para uma molécula de superfície na APC ligada através de uma região de charneira e um domínio Cy3 a um segundo scFv. Vacicorpos contendo como um dos scFv um fragmento de um anticorpo anti-CD19 podem ser usados para justapor aquelas células B a serem destruídas e uma célula efetora que medeia ADCC. Por exemplo, ver, Bogen et al., Publicação do Pedido de Patente U.S. No. 20040253238.

5.1.12. ANTICORPOS LINEARES

Os anticorpos anti-CD19 podem ser anticorpos lineares. Anticorpos lineares compreendem um par de segmentos Fd consecutivos ($V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}$) que formam um par de regiões de ligação a antigénio. Anticorpos lineares podem ser biespecíficos ou monoespecíficos. Ver, Zapata et al., Protein Eng., 8(10):1057-1062 (1995).

5.1.13. ANTICORPO PARENTE

Em certas formas de realização da invenção, o anticorpo anti-CD19 é um anticorpo parente. Um "anticorpo parente" é um anticorpo compreendendo uma sequência de aminoácidos que não tem, ou é deficiente em, um ou mais resíduos de aminoácidos nas ou adjacentes a uma ou mais das suas regiões hipervariáveis comparado com um anticorpo alterado/mutante como aqui divulgado. Assim, o anticorpo parente tem uma região hipervariável mais curta do que a correspondente região hipervariável de um anticorpo mutante como aqui divulgado. O polipéptido parente pode compreender um anticorpo de sequência nativa (isto é, de ocorrência natural) (incluindo uma variante alélica de ocorrência natural) ou um anticorpo com modificações na sequência de aminoácidos pré-existentes (tal como outras inserções, deleções e/ou substituições) de uma sequência de ocorrência natural. Preferencialmente o anticorpo parente é um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.

5.1.14. FRAGMENTOS DE ANTICORPO

"Fragmentos de anticorpo" compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a sua região variável ou de ligação a antigénio. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv;

diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia simples; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo.

Tradicionalmente, estes fragmentos são derivados por via da digestão proteolítica de anticorpos intactos (ver, por exemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24:107-117 (1992) e Brennan et al., *Science*, 229:81 (1985)). No entanto, estes fragmentos podem agora ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo podem ser isolados a partir das bibliotecas de anticorpo de fagos discutidas acima. Alternativamente, fragmentos de Fab' -SH podem ser diretamente recuperados a partir de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992)). De acordo com outra abordagem, os fragmentos F(ab')₂ podem ser isolados diretamente a partir de uma cultura de células hospedeiras recombinantes. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo vão ser evidentes para o especialista. Noutras formas de realização, o anticorpo de escolha é um fragmento Fv de cadeia única (scFv). Ver, por exemplo, WO 93/16185. Em certas formas de realização, o anticorpo não é um fragmento Fab.

5.1.15. ANTICORPOS BIESPECÍFICOS

Anticorpos biespecíficos são anticorpos que têm especificidades de ligação para pelo menos dois epítopos diferentes. Anticorpos biespecíficos exemplificativos podem ligar-se a dois epítopos diferentes do marcador de superfície das células B. Outros desses anticorpos podem ligar-se a um primeiro marcador das células B e depois ligar-se a um segundo marcador de superfície das células B.

Alternativamente, um braço de ligação de um marcador anti-células B pode ser combinado com um braço que se liga a uma molécula desencadeadora num leucócito tal como uma molécula recetora de células T (por exemplo, CD2 ou CD3), ou recetores Fc para IgG (FcγR), de modo a focar os mecanismos de defesa celular das células B. Anticorpos biespecíficos podem também ser usados para localizar agentes citotóxicos para as células B. Estes anticorpos possuem um braço de ligação a marcador das células B e um braço que se liga ao agente citotóxico (por exemplo, saporina, anti-interferão- α , vinca alcaloide, cadeia A de ricina, metolaexato ou hapteno de isótopo radioativo). Anticorpos biespecíficos podem ser preparados como anticorpos de comprimento total ou fragmentos de anticorpo (por exemplo, F(ab')): anticorpos biespecíficos).

Métodos para fazer anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. (Ver, por exemplo, Millstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983); Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991); Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986); Kostelny et al., *J. Immunol*, 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994); Patentes U.S. Nos. 4,474,893; 4,714,681; 4,925,648; 5,573,920; 5,601,81; 95,731,168; 4,676,980; e 4,676,980, WO 94/04690; WO 91/00360; WO 92/200373; WO 93/17715; WO 92/08802; e EP 03089.)

Em certas formas de realização da invenção, as composições e anticorpos para uso nos métodos não compreendem um anticorpo de murino biespecífico com especificidade para CD 19 humano e cadeia epsilon de CD3 do recetor da célula T tal como o anticorpo biespecífico descrito por Daniel et al., *Blood*, 92:4750-4757 (1998). Quando o anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção é

biespecífico, o anticorpo anti-CD19 pode ser humanizado e tem especificidade para CD 19 humano e é capaz de se ligar a uma célula efetora humana tal como, por exemplo, um monócito/macrófago e/ou uma célula natural killer para efetuar a morte celular.

5.1.16. MODIFICAR A FUNÇÃO EFETORA

Pode ser desejável modificar o anticorpo anti-CD19 para uso na invenção no que respeita à função efetora, de modo a melhorar a eficácia do anticorpo no tratamento de malignidades das células B, por exemplo. Por exemplo, resíduo(s) de cisteína podem ser introduzidos na região Fc, permitindo desse modo a formação da ligação dissulfureto intercadeia nesta região. O anticorpo homodimérico gerado desse modo pode ter melhor capacidade de internalização e/ou morte celular mediada pelo complemento aumentada e/ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Ver, Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992) e Shopes, B., J. Immunol., 148:2918-2922 (1992). Anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral melhorada podem também ser preparados usando ligantes cruzados heterobifuncionais como descrito em Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, um anticorpo que tem regiões Fc duplas pode ser modificado e pode portanto ter capacidade melhorada de lise do complemento e ADCC. Ver, Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

Outros métodos de modificação das regiões Fc dos anticorpos de modo a alterar as funções efetoras são conhecidos na técnica (por exemplo, Publicação de Patente U.S. No. 20040185045 e Publicação PCT No. WO 2004/016750, ambas de Koenig et al., que descrevem a alteração da região Fc para melhorar a afinidade de ligação a FcγRIIB quando comparado

com a afinidade de ligação a FC γ RIIA; ver, também, Publicações PCT Nos. WO 99/58572 de Armour et al., WO 99/51642 de Idusogie et al., e U.S. 6,395,272 de Deo et al.). Métodos para modificar a região Fc para diminuir a afinidade de ligação a FC γ RIIB são também conhecidos na técnica (por exemplo, Publicação de Patente U.S. No. 20010036459 e Publicação PCT No. WO 01/79299, ambas de Ravetch et al.). Anticorpos modificados com regiões Fc variantes com afinidade de ligação a FC γ RIIA e/ou FC γ RIIA melhorada quando comparado com uma região Fc de tipo selvagem foram também descritos (por exemplo, Publicação PCT Nos. WO 2004/063351, de Stavenhagen et al.).

Ensaio *in vitro* conhecidos na técnica podem ser usados para determinar se os anticorpos anti-CD19 usados nas composições e para uso nos métodos da invenção são capazes de mediar ADCC, tal como os descritos na Secção 5.3.2.

5.1.17. REGIÕES Fc VARIANTES

São aqui descritas formulações de proteínas compreendendo uma região Fc variante. Ou seja, uma região Fc que não ocorre naturalmente, por exemplo uma região Fc compreendendo um ou mais resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente. Também englobados pelas regiões Fc variantes são regiões Fc que compreendem deleções, adições e/ou modificações de aminoácidos.

Vai ser entendido que a região Fc como aqui usado inclui os polipéptidos compreendendo a região constante de um anticorpo excluindo o primeiro domínio de imunoglobulina da região constante. Assim, Fc refere-se aos dois últimos domínios de imunoglobulina da região constante de IgA, IgD, e IgG, e aos últimos três domínios de imunoglobulina da região constante de IgE e IgM, e a charneira flexível N-

terminal destes domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende domínios de imunoglobulina C γ 2 e C γ 3 (C γ 2 e C γ 3) e a charneira entre C γ 1 (C γ 1) e C γ 2 (C γ 2). Embora os limites da região Fc possam variar, a região Fc da cadeia pesada da IgG humana é normalmente definida para compreender os resíduos C226 ou P230 na sua terminação carboxilo, com a numeração de acordo com o índice EU como em Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA). O "índice EU como estabelecido por Kabat" refere-se à numeração dos resíduos do anticorpo EU IgG1 humano como descrito em Kabat et al. supra. Fc pode referir-se a esta região isoladamente, ou a esta região no contexto de um anticorpo, fragmento de anticorpo, ou proteína de fusão Fc. Uma proteína variante Fc pode ser um anticorpo, fusão Fc, ou qualquer proteína ou domínio proteico que compreende uma região Fc. Particularmente preferidas são proteínas compreendendo regiões Fc variantes, que são variantes que não ocorrem naturalmente de Fc. Nota: Polimorfismos foram observados em várias posições de Fc, incluindo mas não se limitando a Kabat 270, 272, 312, 315, 356, e 358, e portanto podem existir ligeiras diferenças entre a sequência apresentada e as sequências na técnica anterior.

São aqui descritas proteínas variantes de Fc que têm propriedades de ligação alteradas para um ligando Fc (por exemplo, um recetor Fc, C1q) em relação a uma molécula comparável (por exemplo, uma proteína com a mesma sequência de aminoácidos exceto que tem uma região Fc de tipo selvagem). Exemplos de propriedades de ligação incluem mas não se limitam a, especificidade de ligação, constante de dissociação de equilíbrio (KD), taxas de dissociação e associação (Koff e Kon respetivamente), afinidade de ligação e/ou avidéz. É geralmente entendido que uma

molécula ligante (por exemplo, uma proteína Fc variante tal como um anticorpo) com baixa KD é preferível a uma molécula de ligação com KD alta. No entanto, em alguns casos o valor de k_{on} ou k_{off} pode ser mais relevante que o valor de KD. Um especialista na técnica pode determinar que parâmetro cinético é mais importante para uma dada aplicação de anticorpo.

As afinidades e propriedades de ligação de um domínio Fc para o seu ligando, podem ser determinadas por uma variedade de métodos de análise *in vitro* (ensaio de base bioquímica ou imunológica) conhecidos na técnica para determinar interações Fc-FcγR, isto é, ligação específica de uma região Fc a um FcγR incluindo mas não se limitando a, métodos de equilíbrio (por exemplo, ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), ou radioensaio (RIA)), ou cinética (por exemplo, análise BIACORE®), e outros métodos tais como ensaios de ligação indireta, ensaios de inibição competitiva, transferência de energia por ressonância e fluorescência (FRET), eletroforese de gel e cromatografia (por exemplo, gel filtração). Estes e outros métodos podem utilizar um marcador num ou mais dos componentes a serem examinados e/ou empregar uma variedade de métodos de detecção incluindo mas não se limitando a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminescentes, ou isotópicos. Uma descrição detalhada das afinidades de ligação e cinética pode ser encontrada em Paul, W.E., ed., *Fundamental Immunology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Filadélfia (1999), que se foca nas interações anticorpo-imunogénio.

A proteína FC variante pode ter ligação melhorada a um ou mais ligandos Fc em relação a uma molécula comparável. A proteína FC variante pode ter afinidade para um ligando Fc que é pelo menos 2 vezes, ou pelo menos 3 vezes, ou pelo

menos 5 vezes, ou pelo menos 7 vezes, ou pelo menos 10 vezes, ou pelo menos 20 vezes, ou pelo menos 30 vezes, ou pelo menos 40 vezes, ou pelo menos 50 vezes, ou pelo menos 60 vezes, ou pelo menos 70 vezes, ou pelo menos 80 vezes, ou pelo menos 90 vezes, ou pelo menos 100 vezes, ou pelo menos 200 vezes maior que a de uma molécula comparável. A proteína variante de Fc pode ter ligação melhorada para um recetor Fc. A proteína variante de Fc pode ter ligação melhorada para um recetor Fc FcγRIIIA. A proteína variante de Fc pode ter ligação melhorada para o recetor Fc FcRn. A proteína FC variante pode ter ligação melhorada para Clq em relação a uma molécula comparável.

A semivida sérica de proteínas compreendendo regiões Fc pode ser aumentada aumentando a afinidade de ligação da região Fc para FcRn. A proteína variante de Fc pode ter uma semivida sérica melhorada em relação a uma molécula comparável.

"Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos" ou "ADCC" refere-se a uma forma de citotoxicidade em que Ig secretada ligada a recetores Fc (FcRs) presentes em certas células citotóxicas (por exemplo, células Natural Killer (NK), neutrófilos, e macrófagos) permite que estas células efetoras citotóxicas se liguem especificamente a uma célula alvo que possui um antigénio e subsequentemente matem a célula alvo com citotoxinas. Anticorpos de IgG específicos de alta afinidade direcionados para a superfície do "braço" de células alvo as células citotóxicas e são absolutamente necessários para essa morte. A lise da célula alvo é extracelular, requer contacto direto célula-com-célula, e não envolve o complemento. É contemplado que, para além dos anticorpos, outras proteínas compreendendo regiões Fc, especificamente proteínas de fusão Fc, com a capacidade de

se ligar especificamente a uma alvo célula que possui um antígeno são capazes de afetar a citotoxicidade mediada por células. Para simplicidade, a citotoxicidade mediada por células resultante da atividade de uma proteína de fusão Fc é também referida aqui como atividade ADCC.

A capacidade de qualquer proteína FC variante específica de mediar a lise da célula alvo por ADCC pode ser analisada. Para avaliar a atividade ADCC uma proteína FC variante de interesse é adicionada às células alvo em combinação com células efectoras imunes, que podem ser ativadas pelos complexos antígeno anticorpo resultando em citólise da célula alvo. A citólise é geralmente detetada por libertação de marcador (por exemplo substratos radioativos, corantes fluorescentes ou proteínas intracelulares naturais) das células lisadas. Células efectoras úteis para esses ensaios incluem células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) e células Natural Killer (NK). Exemplos específicos de ensaios de ADCC *in vitro* são descritos em Wisecarver et al., 1985 79:277-282; Bruggemann et al., 1987, J Exp Med 166:1351-1361; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods 258:183-191; Patel et al., 1995 J Immunol Methods 184:29-38. Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da proteína FC variante de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al., 1998, PNAS USA 95:652-656.

Uma proteína FC variante pode ter atividade ADCC melhorada em relação a uma molécula comparável. Uma proteína FC variante pode ter atividade ADCC que é pelo menos 2 vezes, ou pelo menos 3 vezes, ou pelo menos 5 vezes ou pelo menos 10 vezes ou pelo menos 50 vezes ou pelo menos 100 vezes maior do que a de uma molécula comparável. Uma proteína FC variante pode ter ligação melhorada para o recetor Fc

Fc γ RIIIA e atividade ADCC melhorada em relação a uma molécula comparável. A proteína FC variante pode ter atividade ADCC melhorada e tempo de semivida sérica melhorado em relação a uma molécula comparável.

"Citotoxicidade dependente do complemento" e "CDC" refere-se à lise de uma célula alvo na presença do complemento. A via de ativação do complemento é iniciada ligando o primeiro componente do sistema do complemento (C1q) a uma molécula, um anticorpo por exemplo, complexado com um antígeno cognato. Para avaliar a ativação do complemento, um ensaio CDC, por exemplo como descrito em Gazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202: 1e63, pode ser realizado. Uma proteína FC variante pode ter melhor atividade CDC em relação a uma molécula comparável. Uma proteína FC variante pode ter atividade CDC que é pelo menos 2 vezes, ou pelo menos 3, ou pelo menos 5 ou pelo menos 10 vezes ou pelo menos 50 vezes ou pelo menos 100 vezes maior do que a de uma molécula comparável. A proteína Fc variante pode ter atividade CDC melhorada e tempo de semivida sérica melhorado em relação a uma molécula comparável.

A presente invenção pode fornecer formulações, em que a região Fc compreende resíduos de aminoácidos que não ocorrem naturalmente numa ou mais posições selecionadas a partir do grupo consistindo em 234, 235, 236, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 252, 254, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 332, 333, e 334 como numerado pelo índice EU como estabelecido por Kabat. Opcionalmente, a região Fc pode compreender um resíduo de aminoácidos que não ocorre naturalmente em posições adicionais e/ou alternativas conhecidas do especialista na técnica (ver, por exemplo, Patentes U.S. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; Publicações

de Patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 e WO 05/040217).

A presente invenção pode fornecer uma formulação de proteína Fc variante, em que a região Fc compreende pelo menos um resíduo de aminoácido que não ocorre naturalmente selecionado a partir do grupo consistindo em 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241 L, 241Y, 241E, 241 R, 243W, 243L 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247V, 247G, 252Y, 254T, 256E, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269H, 269Y, 269F, 269R, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 313F, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N; 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, e 332A como numerado pelo índice EU como estabelecido em Kabat. Opcionalmente, a região Fc pode compreender resíduos de aminoácidos adicionais e/ou alternativos que não ocorrem naturalmente conhecidos do especialista na técnica (ver, por exemplo, Patentes U.S. 5,624,821; 6,277,375; 6,737,056; Publicações de Patente PCT WO 01/58957; WO 02/06919; WO 04/016750; WO 04/029207; WO 04/035752 e WO 05/040217).

A presente invenção pode fornecer uma formulação de proteína Fc variante, em que a região Fc compreende pelo menos um aminoácido que não ocorre naturalmente numa ou

mais das posições selecionadas a partir do grupo consistindo em 239, 330 e 332, como numerado pelo índice EU como estabelecido em Kabat. A presente invenção pode fornecer uma formulação de proteína Fc variante, em que a região Fc compreende pelo menos um aminoácido que não ocorre naturalmente selecionado a partir do grupo consistindo em 239D, 330L e 332E, como numerado pelo índice EU como estabelecido em Kabat. Opcionalmente, a região Fc pode compreender ainda aminoácidos adicionais que não ocorrem naturalmente numa ou mais posições selecionadas a partir do grupo consistindo em 252, 254, e 256, como numerado pelo índice EU como estabelecido em Kabat. A presente invenção pode fornecer uma formulação de proteína Fc variante, em que a região Fc compreende pelo menos um aminoácido que não ocorre naturalmente selecionado a partir do grupo consistindo em 239D, 330L e 332E, como numerado pelo índice EU como estabelecido em Kabat e pelo menos um aminoácido que não ocorre naturalmente numa ou mais posições são selecionados a partir do grupo consistindo em 252Y, 254T e 256E, como numerado pelo índice EU como estabelecido em Kabat.

As variantes Fc da presente invenção podem ser combinadas com outras variantes Fc conhecidas tal como aquelas divulgadas em Ghetie et al., 1997, Nat Biotech. 15:637-40; Duncan et al, 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol 147:2657-2662; Lund et al, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al, 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000,

Célula Immunol 200:16-26; Idusogie et al, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); Patentes U.S. Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; Publicação de Patente U.S. Nos. 2004/0002587 e Publicações PCT WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351. Também englobadas na presente divulgação são regiões Fc que compreendem deleções, adições e/ou modificações. Outras modificações/substituições/adições/deleções adicionais do domínio Fc vão ser facilmente evidentes para o especialista na técnica.

Métodos para gerar regiões Fc que não ocorrem naturalmente são conhecidos na técnica. Por exemplo, substituições e/ou deleções de aminoácidos podem ser geradas por métodos de mutagênese, incluindo, mas não se limitando a, mutagênese dirigida para o sítio (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), mutagênese de PCR (Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990)), e mutagênese de cassete (Wells et al., Gene 34:315-323 (1985)). Preferencialmente, a mutagênese dirigida para o sítio é realizada pelo método de PCR de sobreposição-extensão (Higuchi, em "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70 (1989)). Alternativamente, a técnica de PCR de sobreposição-extensão (Higuchi, *ibid.*) pode ser usada para introduzir qualquer mutação(ões) numa sequência alvo (o ADN inicial). Por exemplo, o primeiro ciclo de PCR no método de sobreposição-extensão envolve amplificar a sequência alvo com um primer externo (primer 1) e um primer de mutagênese

interno (primer 3), e separadamente com um segundo primer externo (primer 4) e um primer interno (primer 2), originando dois segmentos de PCR (segmentos A e B). O primer de mutagénese interno (primers 3) é concebido para conter discrepâncias com a sequência alvo especificando a mutação(ões) desejada. No segundo ciclo de PCR, os produtos do primeiro ciclo, de PCR (segmentos A e B) são amplificados por PCR usando os dois primers externos (primers 1 e 4). O segmento de PCR de comprimento total resultante (segmento C) é digerido com enzimas de restrição e o fragmento de restrição resultante é clonado num vetor apropriado. Como primeiro passo de mutagénese, o ADN inicial (por exemplo, codificando uma proteína de fusão Fc, um anticorpo ou simplesmente uma região Fc), é operacionalmente clonado num vetor de mutagénese. Os primers são concebidos para refletir a substituição de aminoácido desejada. Outros métodos úteis para a produção de regiões Fc variantes são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 5,624,821; 5,885,573; 5,677,425; 6,165,745; 6,277,375; 5,869,046; 6,121,022; 5,624,821; 5,648,260; 6,528,624; 6,194,551; 6,737,056; 6,821,505; 6,277,375; Publicações de Patente U.S. Nos. 2004/0002587 e Publicação PCTs WO 94/29351; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919; WO 04/029207; WO 04/099249; WO 04/063351).

Uma proteína Fc variante pode compreender uma ou mais glicoformas modificadas, isto é, uma composição de hidratos de carbono que é covalentemente ligada à molécula compreendendo uma região Fc. Glicoformas modificadas podem ser úteis para uma variedade de fins, incluindo mas não se limitando a aumentar ou reduzir a função efetora. Glicoformas modificadas podem ser geradas por qualquer método conhecido do especialista na técnica, por exemplo usando estirpes modificadas ou expressão de variantes, por

coexpressão com uma ou mais enzimas, por exemplo DI N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTII1), expressando uma molécula compreendendo uma região Fc em vários organismos ou linhas celulares de vários organismos, ou modificando hidratos de carbono depois da molécula compreendendo a região Fc ter sido expressada. Métodos para gerar glicoformas modificadas são conhecidos na técnica, e incluem mas não se limitam àqueles descritos em Umana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) Pat. U.S. No. 6,602,684; U.S. Ser. No. 10/277,370; U.S. Ser. No. 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnologia Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, N.J.); tecnologia de modificação da glicosilação GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurique, Suíça). Ver, por exemplo, WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49.

5.1.18. GLICOSILAÇÃO DE ANTICORPOS

A glicosilação dos anticorpos utilizados de acordo com a invenção pode ser modificada. Por exemplo, um anticorpo glicosilado pode ser feito (isto é, o anticorpo não tem glicosilação). A glicosilação pode ser alterada para, por exemplo, aumentar a afinidade do anticorpo para um antígeno alvo. Essas modificações dos hidratos de carbono podem ser conseguidas, por exemplo, alterando um ou mais sítios de glicosilação na sequência do anticorpo. Por exemplo, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas que resultam na eliminação de um ou mais sítios de glicosilação da estrutura da região variável para assim eliminar a glicosilação nesse sítio. Essa aglicosilação pode aumentar a afinidade do anticorpo para o antígeno.

Essa abordagem é descrita em mais detalhe nas Patentes U.S. Nos. 5,714,350 e 6,350,861. Alternativamente, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser feitas que resultam na eliminação de um sítio de glicosilação presente na região Fc (por exemplo, Asparagina 297 da IgG). Além disso, anticorpos glicosilados podem ser produzidos em células bacterianas que não possuem o mecanismo necessário de glicosilação.

Adicionalmente ou alternativamente, pode fazer-se um anticorpo que tem um tipo de glicosilação alterada, tal como um anticorpo hipofucosilado com quantidades reduzidas de resíduos de fucosil ou um anticorpo com estruturas GlcNAc bifurcadas aumentadas. Demonstrou-se que esses padrões de glicosilação alterada aumentam a capacidade de ADCC dos anticorpos. Essas modificações de hidratos de carbono podem ser conseguidas, por exemplo, expressando o anticorpo numa célula hospedeira com mecanismo de glicosilação alterado. As células com mecanismo de glicosilação alterado foram descritas na técnica e podem ser usadas como células hospedeiras onde expressar anticorpos recombinantes da invenção para assim produzir um anticorpo com glicosilação alterada. Ver, por exemplo, Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, assim como, Patente Europeia No: EP 1,176,195; Publicações PCT WO 03/035835; WO 99/54342.

5.2. FABRICO/PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CD19

Quando um anticorpo anti-CD19 desejado é modificado, o anticorpo anti-CD19 pode ser produzido a uma escala comercial usando métodos que são bem conhecidos na técnica para fabrico de anticorpos em grande escala. Por exemplo, isto pode ser conseguido usando sistemas de expressão

recombinante tal como, mas não se limitando, aos aqui descritos a seguir.

5.2.1. SISTEMAS DE EXPRESSÃO RECOMBINANTE

A expressão recombinante de um anticorpo para uso na invenção ou variante deste, geralmente requer a construção de um vetor de expressão contendo um polinucleótido que codifica o anticorpo. Quando um polinucleótido codificando uma molécula de anticorpo ou uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, ou porção deste (preferencialmente, mas não necessariamente, contendo o domínio variável da cadeia pesada ou leve), da invenção foi obtido, o vetor para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por tecnologia de ADN recombinante usando técnicas bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 6,331,415. Assim, métodos para preparar uma proteína através da expressão de um polinucleótido contendo uma sequência de nucleótidos codificando um anticorpo são aqui descritos. Métodos que são bem conhecidos dos especialistas na técnica podem ser usados para construir vetores de expressão contendo sequências codificando anticorpos e os sinais de controlo de transcrição e tradução apropriados. Estes métodos incluem, por exemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, e recombinação genética *in vivo*. A invenção fornece, portanto, vetores replicáveis compreendendo uma sequência de nucleótidos codificando uma molécula de anticorpo da invenção, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, um domínio variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo ou uma porção deste, ou uma CDR da cadeia pesada ou leve, operacionalmente ligada a um promotor. Esses vetores podem incluir a sequência de nucleótidos que codifica a região constante da molécula de anticorpo (ver, por exemplo, Publicação Internacional Nos. WO 86/05807 e WO 89/01036; e

Patente U.S. No. 5,122,464) e o domínio variável do anticorpo pode ser clonado nesse vetor para expressão da cadeia pesada inteira, da cadeia leve inteira, ou de ambas as cadeias pesada e leve inteiras.

Alternativamente, os anticorpos anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser feitos usando recombinação homóloga dirigida para produzir todos ou porções dos anticorpos anti-CD19 (ver, Patentes U.S. Nos. 6,063,630, 6,187,305, e 6,692,737). Os anticorpos anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser feitos usando técnicas de recombinação aleatória para produzir todos ou porções dos anticorpos anti-CD19 (ver, Patente U.S. Nos. 6,361,972, 6,524,818, 6,541,221, e 6,623,958). Os anticorpos anti-CD19 podem também ser produzidos em células expressando um anticorpo de uma sequência genômica da célula compreendendo um local de imunoglobulina modificado usando recombinação homóloga específica do sítio mediada por Cre (ver, Patente U.S. No. 6,091,001). Quando a produção de anticorpos humanos é desejada, a célula hospedeira deve ser uma linha celular humana. Estes métodos podem ser usados de forma vantajosa para modificar linhas celulares estáveis que expressam permanentemente a molécula de anticorpo.

Quando o vetor de expressão é transferido para uma célula hospedeira por técnicas convencionais, as células transfetadas são depois cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo da invenção. Assim, a invenção inclui células hospedeiras contendo um polinucleótido codificando um anticorpo da invenção ou fragmentos destes, ou a sua cadeia pesada ou leve, ou porção destes, ou um anticorpo de cadeia única da invenção, operacionalmente ligado a um promotor heterólogo. A expressão de anticorpos de cadeia dupla, vetores

codificando ambas as cadeias pesada e leve podem ser coexpressados na célula hospedeira para expressão da molécula de imunoglobulina inteira, como detalhado a seguir.

Vários sistemas de vetores de expressão hospedeiros podem ser utilizados para expressar os anticorpos anti-CD19 da invenção ou porções destes que podem ser usados na modificação e produção de anticorpos anti-CD19 (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5,807,715). Por exemplo, células de mamífero tal como células de ovário de hamster Chinês (CHO), em conjunto com um vetor tal como o elemento promotor do gene precoce intermediário principal do citomegalovírus humano é um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foecking et al., *Gene*, 45:101 (1986); e Cockett et al., *Bio/Technology*, 8:2 (1990)). Adicionalmente, uma estirpe de células hospedeiras pode ser escolhida a qual modula a expressão de sequências de anticorpo inseridas, ou modifica e processa o produto genético do anticorpo do modo específico desejado. Essas modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) dos produtos proteicos podem ser importantes para o funcionamento da proteína. Diferentes células hospedeiras têm características e mecanismos específicos para o processamento pós-tradução e modificação das proteínas e produtos genéticos. Linhas celulares apropriadas ou sistemas hospedeiros podem ser escolhidos para assegurar a modificação correta e processamento do anticorpo ou porção deste expressada. Para este fim, células hospedeiras eucarióticas que possuem o mecanismo celular para o processamento adequado do transcrito primário, glicosilação, e fosforilação do produto genético podem ser usadas. Essas células hospedeiras de mamífero incluem mas não se limitam a células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e

T47D, NS0 (uma linha celular de mieloma de murino que não produz endogenamente quaisquer cadeias de imunoglobulina), CRL7030 e HsS78Bst.

Linhas celulares humanas desenvolvidas por imortalização de linfócitos humanos podem ser usadas para produzir recombinantemente anticorpos anti-CD19 monoclonais humanos. As linhas celulares humanas PER.C6. (Crucell, Holanda) podem ser usadas para produzir recombinantemente anticorpos anti-CD19 monoclonais humanos.

Em sistemas bacterianos, vários vetores de expressão podem ser selecionados de forma vantajosa dependendo do uso pretendido para a molécula de anticorpo a ser expressada. Por exemplo, quando uma grande quantidade desse anticorpo vai ser produzida, para a produção de composições farmacêuticas compreendendo um anticorpo anti-CD19, vetores que dirigem a expressão de altos níveis de produtos de proteína de fusão que são facilmente purificados podem ser desejáveis. Esses vetores incluem, mas não se limitam, ao vetor de expressão pUR278 de *E. coli* (Ruther et al., EMBO, 12:1791 (1983)), no qual a sequência codificando o anticorpo pode estar ligada individualmente ao vetor em grelha com a região codificante lac Z de modo a que uma proteína de fusão seja produzida; vetores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acid Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem., 24:5503-5509 (1989)); e semelhantes. Vetores pGEX podem também ser usados para expressar polipéptidos estranhos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, essas proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células lisadas por adsorção e ligação a esferas de glutathione agarose de matriz seguido por eluição na presença de glutathione livre. Os vetores pGEX são concebidos para incluir trombina ou

sítios de clivagem da protease fator Xa de modo a que o produto genético alvo clonado possa ser libertado da porção GST.

Num sistema de inseto, o vírus da polihedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) é usado como um vetor para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência codificando o anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo, o gene polihedrina) do vírus e colocada sob controlo de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor polihedrina).

Em células hospedeiras de mamífero, vários sistemas de expressão de base viral podem ser utilizados. Em casos em que um adenovírus é usado como vetor de expressão, a sequência codificando o anticorpo de interesse pode estar ligada a um complexo controlo de transcrição/tradução de adenovírus, por exemplo, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Este gene quimérico pode depois ser inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção numa região não essencial do genoma viral (por exemplo, região E1 ou E3) vai resultar num vírus recombinante que é viável e capaz de expressar a molécula de anticorpo nos hospedeiros infetados (por exemplo, ver, Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:355-359 (1984)). Sinais de iniciação específicos podem também ser necessários para a tradução eficaz das sequências codificantes do anticorpo inseridas. Estes sinais incluem o codão de iniciação ATG e sequências adjacentes. Além disso, o codão de iniciação deve estar geralmente em fase com a grelha de leitura da sequência codificante desejada para assegurar a tradução da inserção completa. Estes sinais de controlo da tradução exógenos e codões de iniciação podem

ser de uma variedade de origens, tanto natural como sintética. A eficácia de expressão pode ser melhorada pela inclusão de elementos potenciadores da transcrição apropriados, terminadores da transcrição, etc. (ver, por exemplo, Bittner et al., *Methods in Enzymol.*, 153:51-544(1987)).

Para a produção de proteínas recombinantes de alto rendimento e a longo prazo, a expressão estável é preferida. Por exemplo, linhas celulares que expressam estavelmente a molécula de anticorpo podem ser modificadas. Em vez de sistemas de expressão temporários que usam vetores de expressão replicantes que contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras podem ser transformadas com ADN controlado por elementos de controlo da expressão apropriados (por exemplo, promotor, potenciador, sequências, terminadores da transcrição, sítios de poliadenilação, etc.), e um marcador selecionável. Depois da introdução de ADN estranho, as células modificadas podem ser deixadas crescer durante 1-2 dias num meio enriquecido, e depois são mudadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo nos seus cromossomas e crescem para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhas celulares. Plasmídeos que codificam o anticorpo anti-CD19 podem ser usados para introduzir o gene/cADN em qualquer linha celular adequada para a produção em cultura. Alternativamente, plasmídeos chamados "vetores de direcionamento" podem ser usados para introduzir elementos de controlo da expressão (por exemplo, promotores, potenciadores, etc.) em localizações cromossómicas apropriadas na célula hospedeira para "ativar" o gene endógeno para anticorpos anti-CD19.

Vários sistemas de seleção podem ser usados, incluindo, mas não se limitando a, genes da timidina quinase do vírus herpes simplex (Wigler et al., Cell, 11:223 (1977)), hipoxantinaguanina fosforibosiltransferase (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:202 (1992)), e adenina fosforibosiltransferase (Lowy et al., Cell, 22:8-17 (1980)) podem ser empregues em células tk-, hgp^{rt}- ou apr^T-, respetivamente. Também, a resistência a antimetabolito pode ser usada como base de seleção para os seguintes genes: *dhfr*, que confere resistência a metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA, 77:357 (1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527 (1981)); *gpt*, que confere resistência a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072 (1981)); *neo*, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Wu e Wu, Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan, Science 260:926-932 (1993); e Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); May, TIB TECH 11 (5):155-2 15 (1993)); e *hygro*, que confere resistência a higromicina (Santerre et al., Gene, 30:147 (1984)). Métodos comumente conhecidos na técnica de tecnologia de ADN recombinante podem ser rotineiramente aplicados para selecionar o clone recombinante desejado, e esses métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli et al. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol., 150:1.

Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem

ser aumentados por amplificação do vetor (para uma revisão, ver, Bebbington e Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. Academic Press, Nova Iorque (1987)). Quando um marcador no sistema de vetores que expressam o anticorpo é amplificável, o aumento do nível de inibidor presente na cultura de células hospedeiras vai aumentar o número de cópias do gene marcador. Visto que a região amplificada está associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo vai também aumentar (Crouse et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3:257 (1983)). Os níveis de expressão de anticorpo podem ser amplificados através do uso de métodos recombinantes e ferramentas conhecidas dos especialistas na técnica de produção de proteínas recombinantes, incluindo tecnologias que remodelam a cromatina circundante e melhoram a expressão de transgenes na forma de um domínio de transcrição artificial ativo.

A célula hospedeira pode ser cotransfetada com dois vetores de expressão da invenção, o primeiro vetor codificando um polipéptido derivado da cadeia pesada e o segundo vetor codificando o polipéptido derivado da cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores idênticos selecionáveis que permitem a expressão igual dos polipéptidos da cadeia pesada e leve. Alternativamente, um único vetor pode ser usado que codifica, e é capaz de expressar, ambos os polipéptidos da cadeia pesada e leve. Nessas situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322:562-65 (1986); e Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2197 (1980)). As sequências codificantes para as cadeias pesadas e leves podem compreender cADN ou ADN genómico.

Quando uma molécula de anticorpo da invenção foi produzida por expressão recombinante, ela pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade para o antigénio específico após Proteína A, e cromatografia em coluna de tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para purificação de proteínas. Além disso, os anticorpos da presente invenção ou fragmentos destes podem ser fundidos a sequências de polipéptidos heterólogos aqui descritas ou de outro modo conhecidas na técnica para facilitar a purificação.

5.2.2. PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE ANTICORPOS

Quando se usam técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplasmático, ou diretamente secretado para o meio. Se o anticorpo for produzido intracelularmente, como primeiro passo, os restos das partículas, quer de células hospedeiras ou de fragmentos lisados, são removidos, por exemplo, por centrifugação ou ultrafiltração. Carter et al., *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992) descrevem um procedimento para isolar anticorpos que são secretados para o espaço periplasmático da *E. coli*. Resumidamente, a pasta de células é descongelada na presença de acetato de sódio (pH 3,5), EDTA, e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) durante cerca de 30 min. Os restos das células podem ser removidos por centrifugação. Quando o anticorpo mutante é secretado para o meio, os sobrenadantes desses sistemas de expressão são geralmente primeiro concentrados usando um filtro de concentração de proteína disponível comercialmente, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore

Pellicon. Um inibidor da protease tal como PMSF pode ser incluído em qualquer um dos passos mencionados acima para inibir a proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes adventícios.

A composição de anticorpos preparada a partir das células pode ser purificada usando, por exemplo, cromatografia com hidroxilapatite, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de troca iónica, eletroforese de gel, diálise, e/ou cromatografia de afinidade separadamente ou em combinação com outros passos de purificação. A adequação da proteína A como um ligando de afinidade depende da espécie e isotipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo mutante. A proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados nas cadeias pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, ou $\gamma 4$ (Lindmark et al., J. Immunol. Methods, 62:1-13 (1983)). A proteína G é recomendada para todos os isotipos de ratinho e para $\gamma 3$ humano (Guss et al., EMBO J., 5:1567-1575 (1986)). A matriz à qual o ligando de afinidade está ligado é mais frequentemente agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis tais como vidro de poros controlados ou poli(estireno-divinil)benzeno permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos dos que são conseguidos com agarose. Quando o anticorpo compreende um domínio CH_3 , a resina Bakerbond ABX (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteínas tais como fracionamento numa coluna de troca iónica, precipitação com etanol, HPLC de Fase Reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina, cromatografia em SEPHAROSE numa resina de troca aniónica ou cationica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatofocagem, SDS-PAGE, e precipitação em sulfato de

amónio estão também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

A seguir a qualquer um dos passos de purificação preliminares, a mistura compreendendo o anticorpo de interesse e contaminantes pode ser submetida a cromatografia de interação hidrofóbica a pH baixo usando um tampão de eluição a um pH entre cerca de 2,5-4,5, preferencialmente realizada a baixas concentrações de sal (por exemplo, desde cerca de 0-0,25 M de sal).

5.3. ANTICORPOS ANTI-CD19 TERAPÊUTICOS

O anticorpo anti-CD19 usado nas composições e para uso nos métodos da invenção é preferencialmente um anticorpo humanizado que preferencialmente medeia ADCC em humanos. Em certas formas de realização, os anticorpos anti-CD19 podem ser anticorpos quiméricos. Em formas de realização preferidas, o anticorpo anti-CD19 é um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado, ou quimérico. O anticorpo anti-CD19 usado nas composições e para uso nos métodos da invenção é preferencialmente um anticorpo humanizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3. O anticorpo anti-CD19 usado nas composições e para uso nos métodos da invenção pode ser um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado do isotipo IgG2 ou IgG4 humano que preferencialmente medeia ADCC.

Enquanto esses anticorpos podem ser gerados usando as técnicas descritas acima, os anticorpos HB12a e HB12b de murino como aqui descrito ou outros anticorpos anti-CD19 disponíveis comercialmente podem ser quimerizados, ou humanizados.

Por exemplo, anticorpos anti-CD19 conhecidos que podem ser usados incluem, mas não são limitados a, HD37 (IgG1) (DAKO,

Carpinteria, CA), BU12 (G.D. Johnson, University of Birmingham, Birmingham, Reino Unido), 4G7 (IgG1) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemanha), J4.119 (Beckman Coulter, Krefeld, Alemanha), B43 (PharMingen, San Diego, CA), SJ25C1 (BD PharMingen, San Diego, CA), FMC63 (IgG2a) (Chemicon Int'l., Temecula, CA) (Nicholson et al., Mol. Immunol., 34:1157-1165 (1997); Pietersz et al., Cancer Immunol. Immunoterapia, 41:53-60 (1995); e Zola et al., Immunol. Cell Biol., 69:411-422 (1991)), B4 (IgG1) (Beckman Coulter, Miami, FL) Nadler et al., J. Immunol., 131:244-250 (1983), e/ou HD237 (IgG2b) (Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Viena, Áustria, 1989; e Pezzutto et al., J. Immunol., 138:2793-2799 (1987)).

Em certas formas de realização, o anticorpo anti-CD19 da invenção compreende a cadeia pesada de HB12a compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:2 (**Fig. 5A**). Noutras formas de realização, o anticorpo anti-CD19 da invenção compreende a cadeia pesada de HB12b compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:4 (**Fig. 5B**).

Em certas formas de realização, o anticorpo anti-CD19 da invenção compreende a cadeia direita de HB12a compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:16 (**Fig. 6A**). Noutras formas de realização, o anticorpo anti-CD19 da invenção compreende a cadeia leve de HB12b compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:18 (**Fig. 6B**).

Em certas formas de realização, o anticorpo é uma variante de isotipo modificado de um anticorpo conhecido (por exemplo, para um isotipo humano IgG1 ou IgG3) tal como os descritos acima (por exemplo, HB12a ou HB12b).

Os anticorpos anti-CD19 usados nas composições e para uso

nos métodos da invenção podem ser anticorpos nus, imunoconjugados ou proteínas de fusão. Preferencialmente os anticorpos anti-CD19 descritos acima para uso nas composições e para uso nos métodos da invenção são capazes de reduzir ou depletar as células B num humano tratado com elas. A depleção das células B pode ser nas células B em circulação, ou em tecidos específicos tais como, mas não se limitando a, medula óssea, baço, tecidos linfoides associados ao intestino, e/ou nódulos linfáticos. Esse depleção pode ser obtido através de vários mecanismos tais como citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), inibição da proliferação das células B e/ou inibição da morte das células B (por exemplo, via apoptose). Por "depleção" das células B entende-se uma redução das células B em circulação e/ou células B em tecidos específicos) de pelo menos cerca de 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais conforme descrito na Secção 5.4.3. Em formas de realização particulares, virtualmente todas as células B detetáveis são depletadas da circulação e/ou tecido(s) específicos. Por "depleção" de imunoglobulina em circulação (Ig) entende-se uma redução de pelo menos cerca de 25%, 40%, 50%, 65%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais conforme descrito na Secção 5.4.3. Conforme aqui descrito, virtualmente todas as Ig detetáveis podem ser eliminadas da circulação.

5.3.1. TRIAGEM DE ANTICORPOS PARA LIGAÇÃO A CD 19 HUMANO

Os ensaios de ligação podem ser usados para identificar anticorpos que se ligam ao antigénio CD19 humano. Ensaios de ligação podem ser realizados tanto como ensaios de ligação diretos como como ensaios de ligação de competição. A ligação pode ser detetada usando ensaios de ELISA padrão ou de citometria de Fluxo padrão. Num ensaio de ligação

direta, um anticorpo candidato é testado quanto à ligação ao antígeno CD19 humano. Os ensaios de triagem compreendem, um segundo passo, determinar a capacidade de causar morte celular ou apoptose das células B expressando CD 19 humano. Ensaios de ligação competitiva, por outro lado, avaliam a capacidade de um anticorpo candidato para competir com um anticorpo anti-CD19 conhecido ou outro composto que se liga ao CD 19 humano.

Num ensaio de ligação direto, o antígeno CD19 humano é contactado com um anticorpo candidato sob condições que permitem a ligação do anticorpo candidato ao antígeno CD19 humano. A ligação pode ocorrer em solução ou numa superfície sólida. Preferencialmente, o anticorpo candidato é previamente marcado para detecção. Qualquer composto detetável pode ser usado para marcação, tal como mas não se limitando a, um isótopo luminescente, fluorescente, ou radioativo ou grupo contendo o mesmo, ou um marcador não isotópico, tal como uma enzima ou corante. Após um período de incubação suficiente para que a ligação ocorra, a reação é exposta às condições e manipulações que removem o excesso ou o anticorpo não especificamente ligado. Tipicamente, envolve a lavagem com um tampão apropriado. Finalmente, é detetada a presença de um complexo CD19-anticorpo.

Num ensaio de ligação competitiva, um anticorpo candidato é avaliado quanto à sua capacidade para inibir ou deslocar a ligação de um anticorpo anti-CD19 conhecido (ou outro composto) ao antígeno CD 19 humano. Um ligando de CD 19 conhecido marcado pode ser misturado com o anticorpo candidato, e colocado sob condições nas quais a interação entre eles deve ocorrer normalmente, com e sem a adição do anticorpo candidato. A quantidade do ligante de CD 19 conhecido marcado que se liga a CD 19 humano pode ser

comparada com a quantidade ligada na presença ou ausência do anticorpo candidato.

Para facilitar a formação e detecção do complexo anticorpo antigénio, o ensaio de ligação pode ser realizado com um ou mais componentes imobilizados numa superfície sólida. O suporte sólido pode ser, mas não é restringido a, policarbonato, polistireno, polipropileno, polietileno, vidro, nitrocelulose, dextrano, nylon, poliacrilamida e agarose. A configuração do suporte pode incluir esferas, membranas, micropartículas, a superfície interior de um frasco de reação tal como uma placa de microtitulação, tubo de ensaio ou outro recipiente de reação. A imobilização de CD 19 humano, ou outro componente, pode ser conseguida através de ligações covalentes ou não covalentes. A ligação pode ser indireta, isto é, através de um anticorpo ligado. O antigénio CD 19 humano e os controlos negativos podem ser etiquetados com um epitopo, tal como glutathione S-transferase (GST) de modo a que a ligação à superfície sólida possa ser mediada por um anticorpo disponível comercialmente tal como anti-GST (Santa Cruz Biotechnology).

Por exemplo, esse ensaio de afinidade de ligação pode ser realizado usando o antigénio CD 19 humano o qual é imobilizado num suporte sólido. Tipicamente, o componente não mobilizado da reação de ligação, neste caso o anticorpo candidato anti-CD19, é marcado para permitir a detecção. Vários métodos de marcação estão disponíveis e podem ser usados, tais como isótopo luminescente, cromóforo, fluorescente, ou radioativo ou grupo contendo o mesmo, e marcadores não isotópicos, tais como enzimas ou corantes. O anticorpo anti-CD19 candidato pode ser marcado com um fluoróforo tal como isotiocianato de fluoresceína (FITC, disponível da Sigma Chemicals, St. Louis).

Finalmente, o marcador que permanece na superfície sólida pode ser detetado por qualquer método de detecção conhecido na técnica. Por exemplo, se o anticorpo anti-CD19 candidato for marcado com um fluoróforo, um fluorímetro pode ser usado para detetar complexos.

O antígeno CD 19 humano pode ser adicionado aos ensaios de ligação na forma de células intactas que expressam antígeno CD19 humano, ou membranas isoladas contendo antígeno CD19 humano. Assim, a ligação direta a antígeno CD19 humano pode ser ensaiada em células intactas em cultura ou em modelos animais na presença e ausência do anticorpo anti-CD19 candidato. Um anticorpo anti-CD19 candidato marcado pode ser misturado com células que expressam antígeno CD19 humano, ou com extratos crus obtidos a partir dessas células, e o anticorpo anti-CD19 candidato pode ser adicionado. As membranas isoladas podem ser usadas para identificar anticorpos anti-CD19 candidatos que interagem com CD 19 humano. Por exemplo, numa experiência típica usando membranas isoladas, as células podem ser modificadas geneticamente para expressar antígeno CD 19 humano. As membranas podem ser recolhidas por técnicas padrão e usadas num ensaio de ligação *in vitro*. O anticorpo anti-CD19 candidato marcado (por exemplo, anticorpo marcado com fluorescência) pode ser ligado às membranas e analisado quanto à atividade específica; a ligação específica pode ser determinada por comparação com ensaios de ligação realizados na presença de excesso de anticorpo anti-CD19 candidato não marcado (frio). Alternativamente, o antígeno CD 19 humano solúvel pode ser recombinantemente expresso e utilizado em ensaios de base não celular para identificar anticorpos que se ligam ao antígeno CD 19 humano. Os polipéptidos CD19 humanos recombinantemente expressados podem ser usados nos

ensaios de triagem de base não celular. Alternativamente, os péptidos correspondentes a uma ou mais das porções de ligação a antígeno CD 19 humano, ou proteínas de fusão contendo uma ou mais das porções de ligação ao antígeno CD19 humano podem ser usados em sistemas de ensaios de base não celular para identificar anticorpos que se ligam a porções do antígeno CD19 humano. Nos ensaios de base não celular, o CD19 humano expresso recombinantemente está ligado a um substrato sólido tal como um tubo de ensaio, poço de microtitulação ou uma coluna, por meios bem conhecidos na técnica (ver, Ausubel et al., supra). Os anticorpos de teste são depois analisados quanto à sua capacidade de ligação ao antígeno CD 19 humano.

Alternativamente, a reação de ligação pode ser realizada em solução. Neste ensaio, o componente marcado é deixado interagir com o seu parceiro de ligação em solução. Se as diferenças de tamanho entre o componente marcado e o seu parceiro(s) de ligação permitir essa separação, a separação pode ser conseguida passando os produtos da reação de ligação através de um ultrafiltro cujos poros permitem a passagem de componente marcado não ligado mas não dos seus parceiro(s) de ligação ou de componente marcado ligado ao seu parceiro(s). A separação pode também ser conseguida usando qualquer reagente capaz de capturar um parceiro de ligação do componente marcado a partir da solução, tal como um anticorpo contra o parceiro de ligação e assim por diante.

Por exemplo, uma biblioteca de fagos pode ser triada passando fagos de uma biblioteca contínua de apresentação de fagos através de uma coluna contendo antígeno CD19 humano purificado, ou derivado, análogo, fragmento, ou domínio, desses, ligado a uma fase sólida, tal como esferas de plástico. Alterando o rigor do tampão de lavagem, é

possível enriquecer em fagos que expressam péptidos com alta afinidade para o antígeno CD19 humano. Os fagos isolados a partir da coluna podem ser clonados e as afinidades podem ser medidas diretamente. Conhecendo quais os anticorpos e suas sequências de aminoácidos que conferem a ligação mais forte ao antígeno CD 19 humano, modelos de computador podem ser usados para identificar os contactos moleculares entre o antígeno CD 19 e o anticorpo candidato.

O suporte sólido é uma membrana contendo antígeno CD 19 humano ligado a uma placa de microtitulação. Os anticorpos candidatos podem, por exemplo, ligar-se a células que expressam anticorpos de bibliotecas cultivados sob condições que permitem a expressão dos membros da biblioteca na placa de microtitulação. Os membros da biblioteca que se ligam ao CD 19 humano são recolhidos. Esses métodos são geralmente descritos por exemplo em Parmley e Smith, 1988, *Gene*, 73:305-318; Fowlkes et al., 1992, *BioTechniques*, 13:422-427; Publicação PCT No. WO94/18318; e em referências aqui citadas acima. Os anticorpos identificados como se ligando a antígeno CD19 humano podem ser de qualquer dos tipos ou modificações de anticorpos descritos acima.

5.3.2. TRIAGEM DE ANTICORPOS QUANTO À FUNÇÃO EFETORA DE ADCC EM HUMANOS

Anticorpos da classe IgG humana são preferidos para uso na invenção porque têm características funcionais tais como uma semivida longa no soro e podem mediar várias funções efetoras (Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Ind., Chapter 1 (1995)). O anticorpo da classe IgG humana é adicionalmente classificado nas seguintes 4 subclasses: IgG1, IgG2, IgG3 e

IgG4. Muitos estudos foram realizados até agora para ADCC e CDC e atividade apoptótica como funções efetoras dos anticorpos da classe IgG, e foi reportado que entre os anticorpos da classe de IgG humana, a subclasse IgG1 tem a atividade ADCC e atividade CDC mais alta em humanos (Chemical Immunology, 65, 88 (1997)).

A expressão da atividade ADCC e atividade CDC e atividade apoptótica dos anticorpos da subclasse IgG1 humana geralmente envolve a ligação da região Fc do anticorpo a um recetor para um anticorpo (daqui em diante referido como "FcγR") existente à superfície das células efetoras tal como células "killer", células "natural killer" ou macrófagos ativados. Vários componentes do complemento podem ser ligados. Em relação à ligação, tem sido sugerido que vários resíduos de aminoácidos na região de charneira e no segundo domínio da região C (daqui em diante referido como "domínio Cy2") do anticorpo são importantes (Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)) e que a cadeia de açúcar no domínio Cy2 (Chemical Immunology, 65, 88 (1997)) é também importante.

Os anticorpos anti-CD19 da invenção podem ser modificados em relação à função efetora, por exemplo, de modo a aumentar ADCC e/ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC) e/ou atividade apoptótica do anticorpo. Isto pode ser conseguido através da introdução de uma ou mais substituições de aminoácidos na região Fc de um anticorpo. Alternativamente ou adicionalmente, podem ser introduzidos resíduo(s) de cisteína na região Fc, permitindo a formação da ligação dissulfureto intercadeia nesta região. Deste modo um anticorpo homodimérico pode ser gerado que terá melhor capacidade de internalização e morte celular mediada por complemento e ADCC aumentadas (Caron et al., J. Exp.

Med., 176:1191-1195 (1992) e Shopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)). Ligantes cruzados heterobifuncionais podem também ser usados para gerar anticorpos homodiméricos com atividade antitumoral aumentada (Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)). Os anticorpos podem também ser manipulados para terem duas ou mais regiões Fc resultando em melhores capacidades de lise do complemento e ADCC (Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, (3)219-230 (1989)).

Outros métodos de manipulação das regiões Fc dos anticorpos de modo a alterar as funções efetoras são conhecidos na técnica (por exemplo, Publicação da Patente U.S. No. 20040185045 e Publicação PCT No. WO 2004/016750; ambas de Koenig et al., que descrevem a alteração da região Fc para aumentar a afinidade de ligação para FcγRIIB em comparação com a afinidade de ligação para FcγRIIA; ver também Publicação PCT Nos. WO 99/58572 de Armour et al., WO 99/51642 de Idusogie et al., e U.S. 6,395,272 de Deo et al.). Métodos de modificar a região Fc para diminuir a afinidade de ligação para FcγRIIB são também conhecidos na técnica (por exemplo, Publicação da Patente U.S. No. 20010036459 e Publicação PCT No. WO 01/79299, ambas de Ravetch et al.). Anticorpos modificados tendo as regiões Fc variantes com afinidade de ligação aumentada para FcγRIIA. e/ou FcγRIIA em comparação com uma região Fc do tipo selvagem foram também descritos (por exemplo, Publicação PCT No. WO 2004/063351, de Stavenhagen et al.).

Pelo menos quatro tipos diferentes de FcγR foram encontrados, os quais são respetivamente chamados FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD 16), e FcγRIV. Em humanos, FcγRII e FcγRIII são adicionalmente classificados em FcγRIIa e FcγRIIb, e FcγRIIIa e FcγRIIIb, respetivamente. FcγR é uma proteína de membrana pertencendo

à superfamília das imunoglobulinas, FcγRII, FcγRIII, e FcγRIV têm uma cadeia α com uma região extracelular contendo dois domínios do tipo imunoglobulina, FcγRI tem uma cadeia α com uma região extracelular contendo três domínios tipo imunoglobulina, como um componente constitutivo, e a cadeia α é envolvida na atividade de ligação da IgG. Adicionalmente, FcγRI e FcγRIII têm uma cadeia γ ou cadeia ζ como um componente constitutivo que tem uma função de sinal de transdução em associação com a cadeia α (Annu. Rev. Immunol., 18, 709 (2000), Annu. Rev. Immunol., 19, 275 (2001)). FcγRIV foi descrito por Bruhns et al., Clin. Invest. Med., (Canadá) 27:3D (2004).

Para avaliar a atividade de ADCC de um anticorpo anti-CD19 de interesse, um ensaio ADCC *in vitro* pode ser usado, tal como o descrito na Patente U.S. No. 5,500,362 ou 5,821,337. Células efetoras úteis para esses ensaios incluem células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e células Natural Killer (NK). Por exemplo, a capacidade de qualquer anticorpo específico para mediar a lise da célula alvo por ativação do complemento e/ou ADCC pode ser testada. As células de interesse são crescidas e marcadas *in vitro*; o anticorpo é adicionado à cultura de células em combinação com células imunitárias as quais podem ser ativadas pelos complexos antígeno anticorpo; isto é, células efetoras envolvidas na resposta ADCC. O anticorpo pode também ser testado quanto à ativação do complemento. Em qualquer caso, a citólise das células alvo é detetada pela libertação do marcador a partir das células lisadas. Efetivamente, os anticorpos podem ser triados usando o soro do próprio paciente como uma fonte de células do complemento e/ou imunitárias. Os anticorpos que são capazes de mediar ADCC em humanos no teste *in vitro* podem depois ser usadas terapeuticamente nesse paciente particular. Alternativamente, ou adicionalmente, a atividade de ADCC da

molécula de interesse pode ser avaliada *in vivo*, por exemplo, num modelo animal tal como o divulgado em Clynes et al., PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Além disso, técnicas para modulação (isto é, aumento ou diminuição) do nível de ADCC, e opcionalmente da atividade CDC, e opcionalmente atividade apoptótica de um anticorpo são bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 6,1994,551; (ver, por exemplo, Chaouchi et al., J. Immunol., 154(7): 3096-104 (1995); Pedersen et al., Blood, 99(4): 1314-1318 (2002); Alberts et al., Molecular Biology of the Cell; Steensma et al., Methods Mol Med., 85: 323-32, (2003)). Os anticorpos da presente invenção podem ser capazes ou podem ter sido modificados para terem a capacidade de induzir ADCC e/ou CDC e/ou uma resposta apoptótica. Preferencialmente, esses ensaios para determinar a função ADCC são praticados usando células efetoras humanas para medir a função ADCC em humanos.

5.3.3. IMUNOCONJUGADOS E PROTEÍNAS DE FUSÃO

De acordo com certos aspetos da invenção, agentes terapêuticos ou toxinas podem ser conjugados com anticorpos anti-CD19 humanizados ou quimerizados, para uso nas composições e para uso nos métodos da invenção. Em certas formas de realização, estes conjugados podem ser gerados como proteínas de fusão (ver, Secção 5.1.8). Exemplos de agentes terapêuticos e toxinas incluem, mas não são limitados a, membros da família enediína de moléculas, tais como caliqueamicina e esperamicina. Toxinas químicas podem também ser tomadas do grupo consistindo em duocarmicina, (ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5,703,080 e Patente U.S. No. 4,923,990), metotrexato, doxorubicina, melfalano, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platina, etoposido, bleomicina e 5-fluorouracilo. Exemplos de

agentes quimioterapêuticos também incluem Adriamicina, Doxorubicina, 5-Fluorouracilo, Citosina-arabinósido (Ara-C), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotere (docetaxel), Busulfan, Citoxiri, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalano, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincreistina, Vinorelbina, Carboplatina, Tenipósido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas (ver, Patente U.S. No. 4,675,187), Melfalano, e outras mostardas de azoto relacionadas.

Por exemplo, "CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200-400 mg/m² de etopósido, e 150-200 mg/m² de carmustina) podem ser usados nas terapias de combinação da invenção. CVB é um regime usado para tratar linfoma não de Hodgkin (Patti et al., Eur. J. Haematol., 51:18 (1993)). Outros regimes quimioterapêuticos de combinação adequados são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas," em Cancer Medicine, Volume 2, 3ª Edição, Holland et al. (eds.), pp. 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). Como uma ilustração, regimes quimioterapêuticos de primeira geração para tratamento de linfoma não de Hodgkin de grau médio incluem C-MOPP (Ciclofosfamida, vincristina, procarbazona e prednisona) e CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisona). Um regime quimioterapêutico útil de segunda geração é m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, e leucovorina), enquanto que um regime de terceira geração adequado é MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina, e leucovorina). Fármacos úteis adicionais incluem fenil butirato e brostatina-1.

Outras toxinas que podem ser usadas nos imunoconjugados da

invenção incluem, lectinas venenosas, lectinas vegetais tais como ricina, abrina, modicina, botulina, e toxinas de difteria. Claro que, combinações das várias toxinas podem também ser acopladas a uma molécula de anticorpo acomodando assim citotoxicidade variável. Exemplos de toxinas que são adequadamente empregues nas terapias de combinação da invenção são ricina, abrina, ribonuclease, DNase I, Enterotoxina-A estafilocócica, proteína anti-viral da fitolaca, gelonina, toxina difterina, exotoxina da *Pseudomonas*, e endotoxina da *Pseudomonas*. Ver, por exemplo, Pastan et al., *Cell*, 47:641 (1986), e Goldenberg et al., *Cancer Journal for Clinicians*, 44:43 (1994). Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usados incluem cadeia A da difteria, fragmentos ativos não ligantes da toxina da difteria, cadeia A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, Alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Ver, por exemplo, WO 93/21232 publicada a 28 de Outubro, 1993.

Toxinas e agentes quimioterapêuticos adequados são descritos em Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), e em Goodman E Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Outras toxinas e/ou agentes quimioterapêuticos adequados são conhecidos dos especialistas na técnica.

O anticorpo anti-CD19 da presente invenção pode também ser

usado em ADEPT conjugando o anticorpo com uma enzima ativadora de pró-fármacos que converte um pró-fármaco (por exemplo, um agente quimioterapêutico peptídico, ver, WO81/01145) num fármaco ativo anticancerígeno. Ver, por exemplo, WO 88/07378 e Patente U.S. No. 4,975,278. A componente de enzima do imunoconjugado útil para ADEPT inclui qualquer enzima capaz de atuar num pró-fármaco de modo a convertê-lo na sua forma mais ativa e citotóxica.

Enzimas que são úteis nos métodos aqui descritos incluem, mas não são limitadas a, fosfatase alcalina útil para converter pró-fármacos contendo fosfato em fármacos livres; arilsulfatase útil para converter pró-fármacos contendo sulfato em fármacos livres; citosina desaminase útil para converter 5-fluorocitosina não tóxica no fármaco anticancerígeno, 5-fluorouracilo; proteases, tais como protease de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-fármacos contendo péptidos em fármacos livres; D-alanilcarboxipeptidases, úteis para converter pró-fármacos que contêm substituintes D-aminoácidos; enzimas de clivagem de hidratos de carbono tal como β -galactosidase e neuraminidase úteis para converter pró-fármacos glicosilados em fármacos livres; β -lactamase útil para converter fármacos derivatizados com α -lactamas em fármacos livres; e penicilina amidases, tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para converter fármacos derivatizados nos seus azotos das aminas com grupos fenoxiacetilo ou fenilacetilo, respetivamente, em fármacos livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como "abzimas," podem ser usados para converter os pró-fármacos da invenção em fármacos livres ativos (ver, por exemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Conjugados anticorpo-abzima podem ser preparados conforme aqui

descrito para administração da abzima como desejado em porções a um humano afetado por uma malignidade das células B.

As enzimas aqui descritas podem ser covalentemente ligadas ao anticorpo por técnicas bem conhecidas na técnica tal como o uso de reagentes de ligação cruzada heterobifuncionais discutido acima. Alternativamente, proteínas de fusão compreendendo pelo menos a região de ligação a antigénio de um anticorpo da invenção ligada a pelo menos uma porção funcionalmente ativa de uma enzima da invenção podem ser construídas usando técnicas de ADN recombinante bem conhecidas na técnica (ver, por exemplo, Neuberger et al., *Nature*, 312:604-608 (1984)).

Modificações covalentes do anticorpo anti-CD19 estão incluídas no âmbito desta divulgação. Elas podem ser feitas por síntese química ou por clivagem enzimática ou química do anticorpo, se aplicável. Outros tipos de modificações covalentes do anticorpo anti-CD19 são introduzidas na molécula reagindo resíduos de aminoácidos alvo do anticorpo com um agente derivatizante orgânico que é capaz de reagir com as cadeias laterais selecionadas ou com os resíduos N- ou C-terminais.

Resíduos de cisteinilo são mais frequentemente reagidos com α -haloacetatos (e correspondentes amins), tais como, ácido cloroacético ou cloroacetainida, para originar derivados carboximetilo ou carboxiamidometilo. De modo semelhante, reagentes de iodo podem também ser usados. Resíduos de cisteinilo são também derivatizados por reação com bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, 3-nitro-2-piridil dissulfureto, metil 2-piridil dissulfureto, p-cloromercuribenzoato, 2-

cloromercuri-4-nitrofenol, ou cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

Resíduos de histidilo são derivatizados por reação com dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente é relativamente específico para a cadeia lateral de histidilo. Para-bromofenacil-brometo também é útil; a reação é preferencialmente realizada em 0,1 M de cacodilato de sódio a pH 6,0.

Resíduos lisil e amino-terminais são reagidos com anidridos do ácido succínico ou outro ácido carboxílico. Derivatização destes agentes tem o efeito de inverter a carga dos resíduos de lisinilo. Outros reagentes adequados para derivatizar resíduos contendo α -amino e/ou resíduos contendo ε -amino incluem imidoésteres tais como metil picolinimidato, fosfato piridoxal, piridoxal, cloroborohidreto, ácido trinitrobenzenosulfônico, 0-metilisourea, 2,4-pentanodiona, e reação catalisada por transaminase com glioxilato.

Resíduos de arginilo são modificados por reação com um ou vários reagentes convencionais, entre eles fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, e ninhidrina. A derivatização de resíduos de arginilo geralmente requer que a reação seja realizada em condições alcalinas devido ao alto pKa do grupo funcional guanidina. Além disso, estes reagentes podem reagir com os grupos ε -amino da lisina assim como o grupo epsilon-amino da arginina.

A modificação específica dos resíduos de tirosilo pode ser feita, com interesse particular na introdução de marcadores espectrais nos resíduos de tirosilo por reação com compostos de diazônio aromáticos ou tetranitrometano. Mais frequentemente, N-acetilimidizole e tetranitrometano são

usados para formar espécies de O-acetil tirosilo e derivados 3-nitro, respetivamente. Resíduos de tirosilo são iodados usando ^{125}I ou ^{131}I para preparar proteínas marcadas para uso em radioimunoensaio.

Grupos laterais carboxilo (aspartilo ou glutamilo) são seletivamente modificados por reação com carbodiimidas ($\text{R-N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$), em que R e R' são grupos alquilo diferentes, tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ou 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Além disso, resíduos de aspartilo e glutamilo são convertidos em resíduos de asparaginilo e glutaminilo por reação com iões amónio.

Resíduos de glutaminilo e asparaginilo são frequentemente desamidados para os resíduos glutamilo e aspartilo correspondentes, respetivamente. Estes resíduos são desamidados sob condições neutras ou básicas. A forma desamidada destes resíduos está dentro do âmbito desta divulgação.

Outras modificações incluem hidroxilação da prolina e lisina, fosforilação dos grupos hidroxilo dos resíduos de serilo ou treonilo, metilação dos grupos α -amino das cadeias laterais da lisina, arginina, e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilação da amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxilo C-terminal.

Outro tipo de modificação covalente envolve acoplar glicósidos quimicamente ou enzimaticamente ao anticorpo. Estes procedimentos são vantajosos porque não requerem a produção do anticorpo numa célula hospedeira que tem capacidade de glicosilação para a glicosilação ligada a N-

ou O-. Dependendo do modo de acoplamento usado, o açúcar(es) pode ser ligado a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo livres, (c) grupos sulfidrilo livres tais como os de cisteína (d) grupos hidroxilo livres tais como os de serina, treonina, ou hidroxiprolina, (e) resíduos aromáticos tais como os de fenilalanina, tirosina, ou triptofano, ou (f) o grupo amida da glutamina. Estes métodos são descritos em WO 87/05330 publicada em 11 Set. 1987, e em Aplin e Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

5.4. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS, ADMINISTRAÇÃO E DOSAGEM

As formulações farmacêuticas da invenção contêm como componente ativo anticorpos anti-CD19s humanizados ou quimérico. As formulações contêm anticorpos nus, imunoconjugados, ou proteínas de fusão numa quantidade eficaz para produzir a resposta desejada numa unidade de peso ou volume adequada para administração a um paciente humano, e são preferencialmente estéreis. A resposta pode, por exemplo, ser medida determinando os efeitos fisiológicos da composição de anticorpo anti-CD19, tal como, mas não se limitando a, depleção das células B em circulação, depleção das células B nos tecidos, regressão de uma malignidade das células B, ou diminuição dos sintomas de doença. Outros ensaios serão conhecidos do especialista na técnica e podem ser empregues para medir o nível da resposta.

5.4.1. FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

Uma composição de anticorpos anti-CD19 pode ser formulada com um transportador farmacêuticamente aceitável. O termo "farmacêuticamente aceitável" significa um ou mais materiais não tóxicos que não interferem com a eficácia da

atividade biológica dos componentes ativos. Essas preparações podem rotineiramente conter sais, agentes de tamponamento, conservantes, transportadores compatíveis, e opcionalmente outros agentes terapêuticos. Essas preparações farmacêuticamente aceitáveis podem conter também rotineiramente enchedores sólidos ou líquidos compatíveis, diluentes ou substâncias encapsulantes que são adequadas para administração a um humano. Quando usados em medicina, os sais devem ser farmacêuticamente aceitáveis, mas sais não farmacêuticamente aceitáveis podem ser convenientemente usados para preparar sais farmacêuticamente aceitáveis dos mesmos e não estão excluídos do âmbito da divulgação. Esses sais farmacologicamente e farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, aqueles preparados a partir dos seguintes ácidos: clorídrico, brômico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, bórico, fórmico, malônico, succínico, e semelhantes. Também, sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser preparados como sais de metais alcalinos ou alcalinoterrosos, tais como sais de sódio, potássio ou cálcio. O termo "transportador" indica um componente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o componente ativo é combinado para facilitar a aplicação. Os componentes de uma composição farmacêutica são também capazes de serem misturados com os anticorpos da presente divulgação, e uns com os outros, de modo a que não haja interação que possa prejudicar substancialmente a eficácia farmacêutica desejada.

Conforme aqui descrito, as composições de anticorpo anti-CD19 podem ser preparadas para armazenamento misturando o anticorpo ou imunoconjugado com o desejado grau de pureza com transportadores fisiologicamente aceitáveis opcionais, excipientes ou estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edição, Osol, A. Ed. (1999)), na forma de

formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Transportadores, excipientes, ou estabilizadores aceitáveis são não tóxicos para os recetores às doses e concentrações empregues, e incluem tampões tais como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (tal como cloreto de octadecildimetilbenzil amónio; cloreto de hexametónio; cloreto de benzalcónio, cloreto de benzetónio; álcool fenólico, butílico ou benzílico; alquil parabenos tais como metil ou propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipéptido de baixo peso molecular (inferior a cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidona; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacáridos, dissacáridos, e outros hidratos de carbono incluindo glucose, manose, ou dextrinas; agentes quelantes tais como EDTA; açucars tais como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contra-íões formadores de sal tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexos Zn-proteína); e/ou tensioativos não-iónicos tais como TWEEN, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG).

As composições de anticorpo anti-CD19 podem também conter, opcionalmente, conservantes adequados, tais como: cloreto de benzalcónio; clorobutanol; parabenos e timerosal.

As composições de anticorpo anti-CD19 podem ser convenientemente apresentadas na forma de doses únicas e podem ser preparadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Todos os métodos incluem o passo de colocar o agente ativo em associação com um transportador o qual constitui um ou mais componentes acessórios. Em geral, as composições são preparadas

colocando o composto ativo uniformemente e intimamente em associação com um transportador líquido, um transportador sólido finamente dividido, ou ambos, e depois, se necessário, moldar o produto.

Composições adequadas para administração parentérica convenientemente compreendem uma preparação de anticorpo anti-CD19 estéril aquosa ou não-aquosa, que é preferencialmente isotónica com o sangue do recetor. Esta preparação pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos usando agentes dispersantes ou molhantes adequados e agentes de suspensão. A preparação injetável estéril pode também ser uma solução ou suspensão estéril injetável num diluente ou solvente aceitável parentericamente não tóxico, por exemplo, como uma solução em 1,3-butano diol. Entre os veículos e solventes de suspensão que podem ser empregues são água, solução de Ringer, e solução isotónica de cloreto de sódio. Adicionalmente, óleos estéreis, fixados são convencionalmente empregues como um solvente ou meio de suspensão. Para este fim qualquer óleo fixado brando pode ser empregue incluindo mono- ou di-glicéridos sintéticos. Adicionalmente, ácidos gordos tais como ácido oleico podem ser usados na preparação de injetáveis. Uma formulação transportadora, adequada para administração oral, subcutânea, intravenosa, intramuscular, etc. pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA. Formulações transportadoras adequadas para várias vias de administração podem ser as mesmas ou semelhantes às descritas para RITUXAN™. Ver, Physicians' Desk Reference (Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ, 2005), pp. 958-960 e 1354-1357. Conforme aqui descrito, as composições de anticorpo anti-CD19 são formuladas para administração intravenosa com cloreto de sódio, citrato de sódio dihidratado, polisorbato

80, e água estéril em que o pH da composição é ajustado até aproximadamente 6,5. Os especialistas na técnica sabem que a injeção intravenosa fornece um modo de administração útil devido à extensão da circulação em distribuir rapidamente anticorpos. A administração intravenosa, no entanto, está sujeita a limitação pela barreira vascular compreendendo células endoteliais da vasculatura e da matriz subendotelial. Ainda assim, a barreira vascular é um problema mais notável para a absorção de anticorpos terapêuticos por tumores sólidos. Os linfomas têm taxas de fluxo sanguíneo relativamente altas, contribuindo para a administração eficaz de anticorpo. Vias de administração intralinfáticas, tais como injeção subcutânea ou intramuscular, ou por cateterização de vasos linfáticos, também fornecem meios úteis para tratar linfomas das células B. Anticorpos anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser autoadministrados subcutaneamente. A composição pode ser formulada como um fármaco liofilizado ou num tampão líquido (por exemplo, PBS e/ou citrato) a cerca de 50 mg/mL.

A formulação aqui pode também conter mais do que um composto ativo como necessário para a indicação específica a ser tratada, preferencialmente aqueles com atividades complementares que não se afetam adversamente. Por exemplo, pode ser desejável fornecer ainda um agente imunossupressor. Essas moléculas estão adequadamente presentes em combinação em quantidades que são eficazes para o fim pretendido.

Os componentes ativos podem também ser aprisionados em microcápsulas preparadas, por exemplo, por técnicas de coacervação ou por polimerização interfacial, por exemplo, microcápsulas de gelatina ou hidroximetilcelulose e microcápsulas poli-(metilmetaciladas), respetivamente, em

sistemas de administração de fármacos coloidais (por exemplo, lipossomas, microsferas de albumina, microemulsões, nano-partículas e nanocápsulas) ou em macroemulsões. Essas técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edição, Osol, A. Ed. (1980).

As formulações a serem usadas para administração *in vivo* são tipicamente estéreis. Isto é facilmente conseguido por filtração através de membranas de filtração estéreis.

Preparações de libertação controlada podem ser preparadas. Exemplos adequados de preparações de libertação controlada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo anti-CD19, matrizes essas que são na forma de artigos moldados, por exemplo, filmes, ou microcápsulas. Exemplos de matrizes de libertação controlada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinilálcool)), polilactidas (Patente U.S. No. 3,773,919), copolímeros do ácido L-glutâmico e γ etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo não degradável, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradáveis tais como LUPRON DEPOT™ (microsferas injetáveis compostas por copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolida), e ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Enquanto polímeros tais como acetato de etileno-vinilo e ácido láctico - ácido glicólico permitem a libertação de moléculas durante mais de 100 dias, alguns hidrogéis libertam proteínas durante períodos de tempo mais curtos. Quando anticorpos encapsulados permanecem no organismo durante um longo período de tempo, estes podem desnaturar ou agregar-se como resultado da exposição à humidade a 37°C, resultando na perda de atividade biológica e possíveis alterações na imunogenicidade. Estratégias racionais podem ser concebidas para estabilização dependendo do mecanismo envolvido. Por exemplo, se se

descobrir que o mecanismo de agregação é a formação de ligações S-S intermoleculares através da troca de tio-dissulfureto, a estabilização pode ser conseguida modificando os resíduos de sulfidrilo, liofilizando a partir de soluções acídicas, controlando o conteúdo de humidade, usando aditivos apropriados, e desenvolvendo composições de matrizes de polímero específico. Os transportadores farmacêuticamente aceitáveis usados nas composições da invenção não afetam ADCC ou CDC em humanos.

As composições de anticorpo anti-CD19 aqui divulgadas pode ser também formuladas como imunolipossomas. Um "lipossoma" uma pequena vesícula composta por vários tipos de lípidos, fosfolípidos e/ou tensioativos que são úteis para a distribuição de um fármaco (tal como os anticorpos anti-CD19 aqui divulgados) a um humano. Os componentes do lipossoma são comumente arranjados numa formação de bicamada, semelhante ao arranjo dos lípidos das membranas biológicas. Lipossomas contendo os anticorpos da invenção são preparados pelos métodos conhecidos na técnica, tal como descrito em Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); e Patente U.S. Nos. 4,485,045 e 4,544,545. Lipossomas com tempo de circulação aumentado são divulgados na Patente U.S. No. 5,013,556. Lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação de fase reversa com uma composição lipídica compreendendo fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrudidos através de filtros de tamanho de poro definido para produzir lipossomas com o diâmetro desejado. Os anticorpos da presente invenção podem ser conjugados com os lipossomas conforme descrito em Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982) por via de reação de troca de dissulfureto. Um agente terapêutico pode também

ser contido no lipossoma. Ver, Gabizon et al., J. National Cancer Inst., (19)1484 (1989).

Algumas das formulações farmacêuticas preferidas incluem, mas não são limitadas a:

(a) um concentrado líquido estéril, livre de conservantes para administração intravenosa (i.v.) do anticorpo anti-CD19, fornecido numa concentração de 10 mg/mL em frascos de utilização única de 100 mg (10 mL) ou 500 mg (50 mL). O produto pode ser formulado para administração i.v. usando cloreto de sódio, citrato de sódio dihidrato, polisorbato e água estéril para injeção. Por exemplo, o produto pode ser formulado em 9,0 mg/mL de cloreto de sódio, 7,35 mg/mL decitrato de sódio dihidrato, 0,7 mg/mL de polisorbato 80, e água estéril para injeção. O pH é ajustado a 6,5.

(b) Um pó liofilizado estéril, num frasco de vidro de utilização única para injeção subcutânea (s.c.). O produto pode ser formulado com sacarose, monohidrato de cloridrato de L-histidina, L-histidina e polisorbato 20. Por exemplo, cada frasco de utilização única pode conter 150 mg de anticorpo anti-CD19, 123,2 mg de sacarose, 6,8 mg de hidrocloreto de L-histidina monohidratado, 4,3 mg de L-histidina, e 3 mg de polisorbato 20. A reconstituição do frasco de utilização única com 1,3 mL de água estéril para produzir injeção origina aproximadamente 1,5 mL de solução para aplicar 125 mg por 1,25 mL (100 mg/mL) de anticorpo.

(c) Um pó liofilizado estéril, sem conservantes para administração intravenosa (i.v.). O produto pode ser formulado com dihidrato de α -trealose, L-histidina HCl, histidina e polisorbato 20 USP. Por exemplo, cada frasco pode conter 440 mg de anticorpo anti-CD19, 400 mg de dihidrato de α,α -trealose, 9,9 mg de L-histidina

HCl, 6,4 mg de L-histidina, e 1,8 mg de polisorbato 20, USP. A reconstituição com 20 mL de água bacteriostática para injeção (BWFI), USP, contendo 1,1% de álcool benzílico como conservante, produz uma solução multidosse contendo 21 mg/mL de anticorpo a um pH de aproximadamente 6.

(d) Um pó liofilizado, estéril, para infusão intravenosa no qual o anticorpo anti-CD19 é formulado com sacarose, polisorbato, fosfato de sódio monobásico monohidratado, e fosfato de sódio dibásico dihidratado. Por exemplo, cada frasco de utilização única pode conter 100 mg de anticorpo, 500 mg de sacarose, 0,5 mg de polisorbato 80, 2,2 mg de fosfato de sódio monobásico monohidratado, e 6,1 mg de fosfato de sódio dibásico dihidratado. Nenhum conservante está presente. A seguir à reconstituição com 10 mL água estéril para injeção, USP, o pH resultante é aproximadamente 7.2.

(e) Uma solução estéril, sem conservantes para administração subcutânea fornecida numa seringa pré-enchida de 1 mL, de utilização única. O produto pode ser formulado com cloreto de sódio, fosfato de sódio monobásico dihidratado, fosfato de sódio dibásico dihidratado, citrato de sódio, ácido cítrico monohidratado, manitol, polisorbato 80 e água para injeção, USP. Hidróxido de sódio pode ser adicionado para ajustar o pH até cerca de 5,2.

Por exemplo, cada seringa pode ser formulada para administrar 0,8 mL (40 mg) de produto de fármaco. Cada 0,8 mL contém 40 mg de anticorpo anti-CD19, 4,93 mg de cloreto de sódio, 0,69 mg de fosfato de sódio monobásico dihidratado, 1,22 mg de fosfato de sódio dibásico dihidratado, 0,24 mg de citrato de sódio, 1,04 de ácido

cítrico monohidratado, 9,6 mg de manitol, 0,8 mg de polisorbato 80 e água para injeção, USP.

(f) Um pó liofilizado, estéril, sem conservantes, contido num frasco de utilização única que é reconstituído com água estéril para injeção (SWFI), USP, e administrado como uma injeção subcutânea (s.c.). O produto pode ser formulado com sacarose, hidrocloreto de histidina monohidratado, L-histidina, e polisorbato. Por exemplo, um frasco de 75 mg pode conter 129,6 mg ou 112,5 mg do anticorpo anti-CD19, 93,1 mg de sacarose, 1,8 mg de cloridrato de L-histidina monohidratado, 1,2 mg de L-histidina, e 0,3 mg de polisorbato 20, e é concebido para aplicar 75 mg do anticorpo em 0,6 mL após a reconstituição com 0,9 mL de SWFI, USP. Um frasco de 150 mg pode conter 202,5 mg ou 175 mg de anticorpo anti-CD19, 145,5 mg de sacarose, 2,8 mg de cloridrato de L-histidina monohidratado, 1,8 mg de L-histidina, e 0,5 mg de polisorbato 20, e é concebido para aplicar 150 mg do anticorpo em 1,2 mL após a reconstituição com 1,4 mL de SWFI, USP.

(g) Um produto liofilizado, estéril, para reconstituição com água estéril para injeção. O produto pode ser formulado como frascos de utilização única para injeção intramuscular (IM) usando manitol, histidina e glicina. Por exemplo, cada frasco de utilização única pode conter 100 mg de anticorpo, 67,5 mg de manitol, 8,7 mg de histidina e 0,3 mg de glicina, e é concebido para aplicar 100 mg de anticorpo em 1,0 mL quando reconstituído com 1,0 mL de água estéril para injeção. Alternativamente, cada frasco de utilização única pode conter 50 mg de anticorpo, 40,5 mg de manitol, 5,2 mg de histidina e 0,2 mg de glicina, e é concebido para aplicar 50 mg de

anticorpo quando reconstituído com 0,6 mL de água estéril para injeção.

(h) Uma solução estéril, sem conservantes, para injeção intramuscular (IM), fornecida numa concentração de 100 mg/mL. O produto pode ser formulado em frascos de utilização única com histidina, glicina, e água estéril para injeção. Por exemplo, cada frasco de utilização única pode ser formulado com 100 mg de anticorpo, 4,7 mg de histidina, e 0,1 mg de glicina num volume de 1,2 mL concebido para aplicar 100 mg de anticorpo em 1 mL. Alternativamente, cada frasco de uso único pode ser formulado com 50 mg de anticorpo, 2,7 mg de histidina e 0,08 mg de glicina num volume de 0,7 mL ou 0,5 mL concebido para aplicar 50 mg de anticorpo em 0,5 mL.

A composição farmacêutica da invenção pode ser estável a 4°C. A composição farmacêutica da invenção pode ser estável à temperatura ambiente.

5.4.2. SEMIVIDA DOS ANTICORPOS

Em certas formas de realização, a semivida de um anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção é pelo menos cerca de 4 até 7 dias. A média de semivida do anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção pode ser pelo menos cerca de 2 até 5 dias, 3 até 6 dias, 4 até 7 dias, 5 até 8 dias, 6 até 9 dias, 7 até 10 dias, 8 até 11 dias, 8 até 12, 9 até 13, 10 até 14, 11 até 15, 12 até 16, 13 até 17, 14 até 18, 15 até 19, ou 16 até 20 dias. A semivida de um anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção pode ser até cerca de 50 dias. As semividas dos anticorpos das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser prolongadas pelos métodos, conhecidos na técnica. Esse

prolongamento pode por sua vez reduzir a quantidade e/ou frequência de dosagem das composições do anticorpo da invenção. Anticorpos com semividas *in vivo* aumentadas e métodos para os preparar são divulgados na Patente U.S. No. 6,277,375; e, Publicações Internacional Nos. WO 98/23289 e WO 97/3461.

A circulação sérica dos anticorpos anti-CD19 da invenção *in vivo* pode também ser prolongada ligando moléculas de polímero inertes tais como polietilenoglicol (PEG) de alto peso molecular aos anticorpos com ou sem um ligante multifuncional através de conjugação específica de sítio do PEG à terminação N- ou C dos anticorpos ou por via de grupos epsilon-amino presentes nos resíduos de lisilo. Derivatização de polímeros lineares ou ramificados que resulta na perda mínima de atividade biológica vai ser usada. O grau de conjugação pode ser monitorizado de perto por SDS-PAGE e espectrometria de massa para assegurar a conjugação adequada das moléculas PEG aos anticorpos. O PEG não reagido pode ser separado dos conjugados anticorpo-PEG por exclusão de tamanho ou por cromatografia de troca iônica. Os anticorpos derivatizados de PEG podem ser testados quanto à atividade de ligação assim como para a eficácia *in vivo* usando métodos conhecidos dos especialistas na técnica, por exemplo, por imunoensaios aqui descritos.

Além disso, os anticorpos das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser conjugados com albumina de modo a fazer o anticorpo mais estável *in vivo* ou ter uma semivida mais longa *in vivo*. As técnicas são bem conhecidas na técnica, ver, por exemplo, Publicação Internacional Nos. WO 93/15199, WO 93/15200, e WO 01/77137; e Patente Europeia No. EP 413, 622.

5.4.3. ADMINISTRAÇÃO E DOSAGEM

A administração das composições da invenção a um paciente humano pode ser por qualquer via, incluindo mas não se limitando a administração intravenosa, intradérmica, transdérmica, subcutânea, intramuscular, por inalação (por exemplo, através de aerossol), bucal (por exemplo, sublingual), tópica (isto é, superfície da pele e mucosas, incluindo superfícies das vias aéreas), intratecal, intra-articular, intrapleural, intracerebral, intra-arterial, intraperitoneal, oral, intralinfática, intranasal, retal ou vaginal, por perfusão através de um cateter regional, ou por injeção intralesional direta. As composições da invenção podem ser administradas por pressão intravenosa ou infusão intravenosa administrada ao longo de um determinado período de tempo (por exemplo, 0,5 até 2 horas). As composições da invenção podem ser administradas por meios peristálticos ou na forma de um depósito, embora a via mais adequada em qualquer caso vai depender, com é bem conhecido na técnica, de fatores como a espécie, idade, género e sobretudo condição do indivíduo, da natureza e gravidade da condição a ser tratada e/ou da natureza da composição particular (isto é, dosagem, formulação) que está a ser administrada. A via de administração pode ser por bolus ou infusão contínua durante um período de tempo, uma ou duas vezes por semana. Noutras formas de realização particulares, a via de administração é por injeção subcutânea, opcionalmente uma ou duas vezes por semana. As composições, e/ou métodos da invenção podem ser administrados em regime ambulatorio.

Em certas formas de realização, a dose de uma composição compreendendo o anticorpo anti-CD19 é medida em unidades de mg/kg de peso corporal do paciente. A dose de uma

composição compreendendo o anticorpo anti-CD19 pode ser medida em unidades de mg/kg do peso corporal magro do paciente (isto é, peso corporal menos o teor de gordura corporal). Ainda noutras formas de realização, a dose de uma composição compreendendo o anticorpo anti-CD19 é medida em unidades de mg/m² de área de superfície corporal do paciente. A dose de uma composição compreendendo o anticorpo anti-CD19 pode ser medida em unidades de mg por dose administrada ao paciente. Qualquer medida de dose pode ser usada em conjunto com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção e as unidades de dosagem podem ser convertidas por meios padrão na técnica.

Os especialistas na técnica vão apreciar que as dosagens podem ser selecionadas com base em vários fatores incluindo a idade, sexo, espécie e condição do indivíduo (por exemplo, estágio da malignidade das células B), o grau desejado de depleção celular, da doença a ser tratada e/ou do anticorpo particular ou fragmento de ligação a antigénio a ser usado e pode ser determinado por um especialista na técnica. Por exemplo, quantidades eficazes das composições da invenção podem ser extrapoladas a partir de curvas de dose-resposta derivadas de sistemas de testes *in vitro* ou a partir de sistemas de testes de modelo animal (por exemplo, roedor do género *Sigmodon* ou macaco). Modelos e métodos para avaliação dos efeitos de anticorpos são conhecidos na técnica (Wooldridge et al., Blood, 89(8): 2994-2998 (1997)). Para malignidades das células B específicas, os regimes terapêuticos padrão na técnica para terapia com anticorpo podem ser usados com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção.

Exemplos de regimes de dosagem que podem ser usados nos métodos aqui descritos incluem, mas não são limitados a, diariamente, três vezes por semana (intermitente),

semanalmente, ou a cada 14 dias. Regimes de dosagem incluem, mas não são limitados a, dosagem mensal ou dosagem a cada 6-8 semanas.

Os especialistas na técnica vão apreciar que as dosagens são geralmente mais altas e/ou a frequência de administração maior no tratamento inicial em comparação com os regimes de manutenção.

Os anticorpos anti-CD19 aqui descritos ligam-se às células B e, assim, podem resultar na depleção das células B mais eficiente (isto é, a doses mais baixas) (conforme aqui descrito). Graus mais elevados de ligação podem ser obtidos quando a densidade de CD 19 humano à superfície das células B de um paciente é alta. Dosagens do anticorpo (opcionalmente num transportador farmacêuticamente aceitável como parte de uma composição farmacêutica) podem ser pelo menos cerca de 0,0005, 0,001, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,375, 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 20, 37,5, ou 50 mg/m² e/ou menos de cerca de 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37,5, 20, 15, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,375, 0,1, 0,075 ou 0,01 mg/m². A dosagem pode ser entre cerca de 0,0005 até cerca de 200 mg/m², entre cerca de 0,001 e 150 mg/m², entre cerca de 0,075 e 125 mg/m², entre cerca de 0,375 e 100 mg/m², entre cerca de 2,5 e 75 mg/m², entre cerca de 10 e 75 mg/m², e entre cerca de 20 e 50 mg/m². A dosagem de anticorpo anti-CD19 usada pode ser pelo menos cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5 mg/kg de peso corporal de um paciente. A dose de anticorpo anti-CD19 usada pode ser pelo menos cerca de 1 até 10, 5 até 15, 10 até 20, ou 15 até 25 mg/kg de peso corporal de um paciente.

A dose de anticorpo anti-CD19 usada pode ser pelo menos cerca de 1 até 20,3 até 15, ou 5 até 10 mg/kg de peso corporal de um paciente. A dose de anticorpo anti-CD19 usada pode ser pelo menos cerca de 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 mg/kg de peso corporal de um paciente. Uma dosagem de utilização única do anticorpo (opcionalmente num transportador farmacologicamente aceitável como parte de uma composição farmacêutica) pode ser pelo menos cerca de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118; 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222; 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, ou 250 microgramas/m². A dose pode ser até 1 g por dosagem de utilização única.

Todas as doses acima são exemplificativas e podem ser usadas em conjunto com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção, no entanto quando um anticorpo anti-CD19 é usado em conjunto com uma toxina ou agente radioterapêutico as doses mais baixas descritas acima são preferidas. Quando o paciente tem baixos níveis de densidade de CD 19, as doses mais baixas descritas acima são preferidas.

Quando são usados anticorpos anti-CD19 quiméricos, a dose ou quantidade do anticorpo quimérico pode ser maior que cerca de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, ou 16 mg/kg do peso corporal do paciente. Quando são usados anticorpos quiméricos anti-CD19, a dose ou quantidade do anticorpo quimérico pode ser menos de cerca de 1, 0,9, 0,8,

0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, ou 0,1 mg/kg do peso corporal do paciente.

Em algumas formas de realização desta invenção, os anticorpos e/ou composições desta invenção podem ser administrados numa dose menor que cerca de 375 mg/m²; a uma dose menor que cerca de 37,5 mg/m²; a uma dose menor que cerca de 0,375 mg/m²; e/ou a uma dose entre cerca de 0,075 mg/m² e cerca de 125 mg/m². Regimes de dosagem da invenção podem compreender doses baixas, administradas a intervalos repetidos. Por exemplo, as composições da invenção podem ser administradas a uma dose menor que cerca de 375 mg/m² a intervalos de aproximadamente a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7., 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, ou 200 dias.

A dosagem especificada pode resultar na depleção das células B em humanos tratados usando as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção durante um período de pelo menos cerca de 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 20, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150 ou 180 dias ou mais. Em certas formas de realização, as células pré B (não expressando a imunoglobulina de superfície) estão depletadas. Em certas formas de realização, células B maduras (expressando a imunoglobulina de superfície) são depletadas. Noutras formas de realização, todos os tipos de células B não malignos podem apresentar-se depletados. Qualquer destes tipos de células B pode ser usado para medir a depleção das células B. A depleção das células B pode ser medido em fluidos corporais tais como soro sanguíneo, ou em tecidos tais como medula óssea. As células B podem ser depletadas em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% em comparação com os níveis de células B no paciente a ser tratado antes do uso das composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção. As células B podem ser depletadas em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% em

comparação com níveis de células B padrão típicos para humanos. Os níveis de células B padrão típicos para humanos são determinados usando pacientes comparáveis com o paciente em tratamento em relação à idade, sexo, peso, e outros fatores.

Uma dosagem de cerca de 125 mg/m^2 ou menos de um anticorpo ou fragmento de ligação a antigénio resulta na depleção das células B durante um período de pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, ou 200 dias. Uma dosagem de cerca de $37,5 \text{ mg/m}^2$ ou menos depleta as células B durante um período de pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, ou 200 dias. Uma dosagem de cerca de $0,375 \text{ mg/m}^2$ ou menos resulta na depleção das células B durante pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 45 ou 60 dias. Uma dosagem de cerca de $0,075 \text{ mg/m}^2$ ou menos resulta na depleção das células B durante um período de pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, ou 200 dias. Uma dosagem de cerca de $0,01 \text{ mg/m}^2$, $0,005 \text{ mg/m}^2$ ou mesmo $0,001 \text{ mg/m}^2$ ou menos resulta na depleção das células B durante pelo menos cerca de 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 90, 120, 150, ou 200 dias. A dosagem pode ser administrada por qualquer via adequada, mas é opcionalmente administrada por uma via subcutânea.

Como outro aspeto, a invenção fornece a verificação que a depleção das células B e/ou tratamento dos distúrbios das células B podem ser conseguidos com dosagens mais baixas de anticorpo ou fragmentos de anticorpo do que as empregue nos métodos atualmente disponíveis. A presente invenção pode fornecer um método para depletar as células B e/ou tratar um distúrbio das células B, compreendendo administrar a um humano, uma quantidade eficaz de um anticorpo que se liga especificamente a CD19, em que uma dosagem de cerca de 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200,

175, 150, 125, 100, 75, 60, 50, 37,5, 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,375, 0,25, 0,1, 0,075, 0,05, 0,001, 0,0005 mg/m² ou menos resulta na depleção das células B (circulantes e/ou células B dos tecidos) de 25%, 35%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou mais durante um período de pelo menos cerca de 3, 5, 7, 10, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, ou 200 dias ou mais. Uma dosagem de cerca de 125 mg/m² ou 75 mg/m² ou menos resulta em pelo menos cerca de 50%, 75%, 85% ou 90% de depleção das células B durante pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120, 150 ou 180 dias. Uma dosagem de cerca de 50, 37,5 ou 10 mg/m² resulta em depleção de pelo menos cerca de 50%, 75%, 85% ou 90% das células B durante pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 60, 75, 90, 120 ou 180 dias. Uma dosagem de cerca de 0,375 ou 0,1 mg/m² resulta em depleção de pelo menos cerca de 50%, 75%, 85% ou 90% das células B durante pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30, 60, 75 ou 90 dias. Uma dosagem de cerca de 0,075, 0,01, 0,001, ou 0,0005 mg/m² resulta em depleção de pelo menos cerca de 50%, 75%, 85% ou 90% das células B durante pelo menos cerca de 7, 14, 21, 30 ou 60 dias.

A dose pode ser aumentada ou reduzida para manter uma dose constante no sangue ou num tecido, tal como, mas não se limitando a, medula óssea. A dose pode ser aumentada ou reduzida cerca de 2%, 5%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, e 95% de modo a manter o nível desejado do anticorpo das composições e para uso nos métodos da invenção.

A dosagem pode ser ajustada e/ou a taxa de fusão pode ser reduzida com base na resposta imunogénica do paciente às composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção.

Uma dose de ataque do anticorpo anti-CD19 e/ou composição

da invenção pode ser administrada primeiro seguida por uma dose de manutenção até a malignidade das células B a tratar progrida ou seguida por um curso de tratamento definido (por exemplo, CAMPATH™, MYLOTARG™, ou RITUXAN™, o último dos quais permite que os pacientes sejam tratados com um número definido de doses que aumentou à medida que dados adicionais foram gerados).

De acordo com outro aspeto da invenção, um paciente pode ser pré-tratado com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção para detetar, minimizar a resposta imunogénica, ou minimizar os efeitos adversos das composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção.

5.4.4. TESTE DE TOXICIDADE

A tolerância, toxicidade e/ou eficácia das composições e/ou regimes de tratamento da presente invenção podem ser determinados através de procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinar a LD50 (a dose letal para 50% da população), a ED50 (a dose terapeuticamente eficaz para 50% da população), e IC50 (a dose eficaz para atingir uma inibição de 50%). A dose pode ser uma dose eficaz para atingir pelo menos uma depleção de 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, ou 99% das células B circulantes ou imunoglobulinas circulantes, ou ambas. A proporção de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expresso como a proporção LD50/ED50. Tratamentos que exibem grandes índices terapêuticos são preferidos. Enquanto tratamentos que exibem efeitos secundários tóxicos podem ser usados, devem ser tomados cuidados para conceber um sistema de administração que direcione esses agentes para células expressando CD 19 de modo a minimizar os danos

potenciais para células negativas para CD 19 e, desse modo, reduzir os efeitos secundários.

Dados obtidos a partir de ensaios de cultura de células e estudos animais podem ser utilizados na formulação de uma gama de dosagens das composições e/ou regimes de tratamento para uso em humanos. A dosagem desses agentes cai preferencialmente num intervalo de concentrações em circulação que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro deste intervalo dependendo da forma de dosagem empregue e da via de administração utilizada. Para qualquer terapia usada nos métodos da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada através de modelos animais apropriados. Dependendo da espécie do modelo animal, a dose é dimensionada para uso humano de acordo com as fórmulas aceites na técnica, por exemplo, como fornecido por Freireich et al., Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, monkey, dog, and human, Cancer Chemotherapy Reports, NCI 1966 40:219-244. Dados obtidos de ensaios de cultura de células podem ser úteis para prever a potencial toxicidade. Estudos animais podem ser usados para formular uma dose específica para atingir uma gama de concentração plasmática em circulação que inclui a IC50 (isto é, a concentração do composto de teste que atinge uma inibição de metade do máximo dos sintomas) como determinado em cultura de células. Essas informações podem ser usadas mais precisamente para determinar doses úteis em humanos. Os níveis de fármaco plasmático podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alta resolução, ELISA, ou por ensaios à base de células.

5.5. DIAGNÓSTICO DO PACIENTE, ESTÁDIO E REGIMES TERAPÊUTICOS

O regime e dose de tratamento usados com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção podem ser escolhidos com base em vários fatores incluindo, mas não se limitando a, estágio da doença ou distúrbio das células B a ser tratada. Regimes de tratamento apropriados podem ser determinados por um especialista na técnica para estádios particulares da doença ou distúrbio das células B num paciente ou população de pacientes. Curvas de dose-resposta podem ser geradas usando protocolos padrão na técnica de modo a determinar a quantidade eficaz das composições da invenção para tratar pacientes em diferentes estádios da doença ou distúrbio das células B. Em geral, pacientes em estádios mais avançados da doença ou distúrbio das células B vão exigir doses mais altas e/ou doses mais frequentes que podem ser administradas durante períodos de tempo mais longos em comparação com pacientes em estádios mais recentes da doença ou distúrbio das células B.

Os anticorpos anti-CD19 das composições para uso nos métodos da invenção podem ser usados para tratar doenças das células B, incluindo malignidades das células B. O termo "malignidade das células B" inclui qualquer malignidade que deriva de uma célula da linhagem das células B. Malignidades das células B exemplificativas incluem, mas não são limitadas a: linfoma não de Hodgkin subtipo de células B (NHL) incluindo NHL de baixo grau/folicular, NHL linfocítico pequeno (SL), NHL de grau intermédio/folicular, NHL difuso de grau intermédio, NHL imunoblástico de alto grau, NHL linfoblástico de alto grau, NHL de células não clivadas pequenas de alto grau; linfoma das células do manto, e NHL doença volumosa; linfoma de Burkitt; mieloma múltiplo; leucemia linfoblástica aguda pré-B e outras malignidades que derivam dos precursores de células B iniciais; leucemia linfocítica aguda comum (ALL);

leucemia linfocítica crónica (CLL) incluindo CLL mutada por imunoglobulina e CLL não mutada por imunoglobulina; leucemia de células pilosas; leucemia linfoblástica aguda de tipo Null; Macroglobulinémia de Waldenstrom; linfoma difuso das células B grandes (DLBCL) incluindo DLBCL das células tipo B de centro germinativo (GCB), DLBCL das células tipo B ativadas (ABC), e DLBCL tipo 3; leucemia pró-linfocítica; doença da cadeia leve; plasmocitoma; mieloma osteoclerótico; leucemia de células plasmáticas; gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS); mieloma múltiplo latente (SMM); mieloma múltiplo indolente (IMM); linfoma de Hodgkin incluindo tipo pré-dominante de linfócito clássico e nodular; linfoma linfoplasmático (LPL); e linfoma da zona marginal incluindo linfoma do tecido linfoide associado a mucosa gástrica (MALT).

Os investigadores mostraram que os anticorpos e composições da invenção podem depletar as células B maduras. A invenção pode ser empregue para tratar malignidades das células B maduras (isto é, que expressa Ig na superfície celular) incluindo mas não se limitado a linfoma folicular, linfoma das células do manto, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, linfoma difuso das células B grandes (DLBCL) incluindo o DLBCL das células tipo B de centro germinativo (GCB), DLBCL de células tipo B ativadas (ABC), e DLBCL tipo 3, linfoma de Hodgkin incluindo tipo pré-dominante de linfócito clássico e nodular, linfoma linfoplasmático (LPL), linfoma da zona marginal incluindo linfoma do tecido linfoide associado a mucosa gástrica (MALT), e leucemia linfocítica crónica (CLL) incluindo CLL mutada por imunoglobulina e CLL não mutada por imunoglobulina.

Além disso, o CD 19 é expresso mais cedo no desenvolvimento das células B do que, por exemplo, CD20, e é, portanto, particularmente adequado para o tratamento de malignidades

de pré-células B e células B imaturas (isto é, que não expressam Ig na superfície celular), por exemplo, na medula óssea. Malignidades de pré-células B e das células B imaturas ilustrativas incluem, mas não são limitadas a, leucemia linfoblástica aguda.

A invenção pode ser praticada para tratar tumores extranodais.

5.5.1. DIAGNÓSTICO E ESTÁDIO DE MALIGNIDADES DAS CÉLULAS B

A progressão do cancro, tal como uma doença ou distúrbio das células B capaz de formar tumor (por exemplo, linfoma não de Hodgkin, linfoma difuso das células B grandes, linfoma folicular, e linfoma de Burkitt) é tipicamente caracterizado pelo grau em que o cancro se espalhou pelo corpo e é muitas vezes dividido nas quatro etapas seguintes que são prognósticas do resultado. Estádio I: O cancro está localizado num tecido particular e não se espalhou aos nódulos linfáticos. Estádio II: O cancro disseminou-se aos nódulos linfáticos da vizinhança, isto é, metástases. Estádio III: O cancro é encontrado nos nódulos linfáticos em regiões do corpo fora do tecido de origem e pode compreender uma massa ou tumores múltiplos em oposição a uma. Estádio IV: O cancro disseminou-se para uma parte distante do corpo. O estágio do cancro pode ser determinado através de observações clínicas e métodos de testagem que são bem conhecidos dos especialistas na técnica. Os estádios de cancro descritos acima são usados tradicionalmente em conjunto com diagnóstico clínico de cancro caracterizado pela formação de tumor, e pode ser usado em conjunto com as composições e anticorpos para uso nos métodos da presente invenção para tratar doenças e distúrbios das células B. Tipicamente uma doença em estágio

precoces significa que a doença permanece localizada na porção do corpo de um paciente ou não criou metástases.

No que se refere a doenças e distúrbios das células B que não formam tumores tais como, mas não se limitando a, mieloma múltiplo, os critérios para determinar o estágio da doença diferem. O sistema de estadiamento de Durie-Salmon tem sido largamente usado. Neste sistema de estadiamento, o estágio clínico de doença (estádio I, II, ou III) é baseado em várias medições, incluindo níveis de proteína M, o número de lesões ósseas líticas, valores de hemoglobulina, e níveis séricos de cálcio. Os estádios são ainda divididos de acordo com a função renal (rim) (classificada como A ou B). De acordo com o Sistema de Estadiamento de Durie-Salmon o Estádio I (massa de poucas células) é caracterizado por todos os seguintes: Valor de Hemoglobina >10 g/dL; Valor normal sérico de cálcio ou ≤ 12 mg/dL; Raio X do osso, estrutura óssea normal (escala 0) ou somente plasmocitoma ósseo solitário; e baixa taxa de produção de componente M: valor de IgG <5 g/dL, valor de IgA <3 g/d, proteína de Bence Jones <4 g/24 h. Pacientes de Estádio I tipicamente não têm danos ou sintomas em órgãos ou tecidos relacionados. O Estádio II (massa de células intermédia) é caracterizado por não se encaixa no estágio I nem no estágio III. O Estádio III (massa de muitas células) é caracterizado por um ou mais dos seguintes: Valor de Hemoglobina $<8,5$ g/dL; Valor de cálcio sérico > 12 mg/dL; Lesões ósseas líticas avançadas (escala 3); Taxa de produção de componente M alta: Valor de IgG >7 g/dL, Valor de IgA >5 g/dL, proteína de Bence Jones >12 g/24 h Subclassificação (ou A ou B), em que A é Função renal relativamente normal (valor de creatinina sérica $<2,0$ mg/dL) e B é Função renal anormal (valor de creatinina sérica $\geq 2,0$ mg/dL).

Outro sistema de estadiamento para mieloma é o Sistema de Estadiamento Internacional (ISS) para mieloma. Este sistema pode discriminar mais eficientemente entre grupos de estadiamento e é baseado nos níveis séricos facilmente medidos de beta 2-microglobulina ($\beta 2$ -M) e albumina. De acordo com o ISS para mieloma, o Estádio I é caracterizado por $\beta 2$ -M $< 3,5$ e Albumina $\geq 3,5$, o Estádio II é caracterizado por $\beta 2$ -M $< 3,5$ e albumina $< 3,5$ ou $\beta 2$ -M $3,5 - 5,5$, e o Estádio III é caracterizado por $\beta 2$ -M $> 5,5$ (Multiple Myeloma Research Foundation, New Canaan, CT).

O estágio de uma malignidade das células B num paciente é uma determinação clínica. Como acima indicado, em relação a tumores sólidos, a propagação, localização, e número de tumores são os fatores primários na determinação clínica do estágio. A determinação do estágio em pacientes com malignidades das células B sem formação de tumor pode ser mais complexa requerendo medições dos níveis séricos como descrito acima.

As descrições de estádios de doença e distúrbio das células B acima não são limitativas. Outras características conhecidas na técnica para o diagnóstico de doenças e distúrbios das células B podem ser usadas como critério para determinar os estádios das doenças e distúrbios das células B em pacientes.

5.5.2. CRITÉRIOS CLÍNICOS PARA DIAGNOSTICAR MALIGNIDADES DAS CÉLULAS B

Critérios de diagnóstico para diferentes malignidades das células B são conhecidos na técnica. Historicamente, o diagnóstico é baseado tipicamente numa combinação de aparência microscópica e imunofenótipo. Mais recentemente,

técnicas moleculares tais como perfil de expressão de genes têm sido aplicadas para desenvolver definições moleculares de malignidades das células B (ver, por exemplo, Shaffer et al., *Nature* 2:920-932(2002)). Métodos exemplificativos de diagnóstico clínico de malignidades particulares das células B são fornecidos abaixo. Outros métodos adequados serão evidentes para os especialistas na técnica.

5.5.2.1. NHL FOLICULAR

Em geral, a maioria dos NHL (com a exceção de linfoma das células do manto) têm genes de imunoglobulina altamente mutados que parecem ser o resultado de hipermutação somática (SHM). As anomalias genéticas mais comuns em NHL são translocações e mutações do gene *BCL6*.

NHL folicular é frequentemente um linfoma indolente das células B com um padrão de crescimento folicular. É o segundo linfoma mais comum nos Estados Unidos e Europa Ocidental. A idade média em que esta doença aparece é 60 anos e há uma ligeira predominância feminina. Linfadenopatia indolor é o sintoma mais comum. Os testes frequentemente indicam o envolvimento da medula sanguínea e por vezes do sangue periférico. NHL folicular é dividido em graus citológicos com base na proporção de células grandes no folículo com os graus a formarem um contínuo desde pequenas células clivadas foliculares até à predominância de células grandes. (Ver, S. Freedman, et al., *Follicular Lymphoma*, pp. 367-388, In *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); T. Lister et al., *Follicular Lymphoma*, pp. 309-324, In *Malignant Lymphoma*, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

A maioria de NHL folicular é caracterizado por uma

translocação entre os cromossomas 14 e 18 resultando na sobre-expressão de *BCL2*. NHL folicular é também caracterizado por SHM e por SHM contínuo e um perfil de expressão de gene semelhante às células B de centro germinativo (GC) (ver, por exemplo, Shaffer et al., *Nature* 2:920-932 (2002)), as quais são as células putativas de origem para este tumor maligno. Rearranjos de cadeia pesada e leve são típicos. As células tumorais desta doença expressam a imunoglobulina de superfície monoclonal em que a maioria expressa IgM. Quase todas as células tumorais NHL foliculares expressam os antigénios CD19, CD20, CD79a, CD21, CD35 e CD10 mas falham a expressão de CD5 e CD43. Infiltração paratrabecular com pequenas células clivadas é observada na medula óssea. (Ver, S. Freedman et al., *Follicular Lymphoma*, pp. 367-388, In *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); T. Lister et al., *Follicular Lymphoma*, pp. 309-324, In *Malignant Lymphoma*, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

Um diagnóstico de NHL folicular geralmente depende de biópsia de um nódulo excisado com vista a avaliar a arquitetura do tecido e características citológicas. Aspirações com agulha fina normalmente não são adequadas uma vez que é pouco provável que o procedimento forneça tecido que possa ser avaliado e não consegue fornecer tecido suficiente para testes adicionais. Biópsias bilaterais da medula óssea são também indicadas uma vez que o envolvimento pode ser irregular. Procedimentos de diagnóstico adicionais incluem radiografia de tórax, peito, abdômen, pescoço e tomografia computadorizada da pélvis (CT), hemograma completo, e perfil químico. Podem ser usados citometria de fluxo e imunohistoquímica para distinguir entre NHL folicular e outros linfomas das

células B maduras. (Ver, S. Freedman et al., Follicular Lymphoma, pp. 367-388, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); T. Lister et al., Follicular Lymphoma, pp. 309-324, In Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

5.5.2.2. LINFOMA DAS CÉLULAS DO MANTO

O Linfoma das células do manto localiza-se na região do manto de folículos secundários e é caracterizado por um padrão de crescimento nodular e/ou difuso. Pacientes de linfoma das células do manto têm idade média de 60-65 anos com a doença a afetar predominantemente o sexo masculino. Para fins de diagnóstico, a característica de apresentação usual é uma linfadenopatia generalizada. Adicionalmente, o baço está muitas vezes aumentado. Este linfoma das células B está associado com um t(11;14) entre o local IgH e o gene ciclina D1, que resulta na sobre-expressão de ciclina D1. Mais de 50% dos casos mostram anomalias cromossômicas adicionais. O linfoma das células do manto não é tipicamente caracterizado por SHM. (Ver, W. Hiddemann et al., Mantle Cell Lymphoma, pp. 461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); D. Weisenburger et al., Mantle Cell Lymphoma, pp. 28-41, In Malignant Lymphoma, B. Hancock et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I: (2000)).

Imunofenotipagem (citometria de fluxo ou secção de congelamento) imunohistoquímica das células do linfoma do manto celular mostra que elas são quase sempre monoclonais, portadoras de IgM de superfície. O linfoma de células do manto celular notou-se também que suporta IgD à superfície. As células expressam os antigénios CD19, CD20, CD22 e CD24,

mas não CD23. Também expressam os antígenos de superfície CD5 mas não os CD10, distinguindo-as das do verdadeiro linfoma das células centrais do folículo os quais são quase sempre negativos para CD5. É frequentemente verificado que o envolvimento extranodal incluiu infiltração da medula óssea e tumores do fígado e do trato gastrointestinal. Anemia moderada e expressão leucêmica não é incomum no linfoma das células do manto. (Ver, A. Lal et al., Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma, pp. 181-220, In W. Finn et al., eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004); W. Hiddemann et al., Mantle Cell Lymphoma, pp. 461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

O diagnóstico do linfoma das células do manto envolve exame do sangue periférico assim como biópsia da medula óssea e de nódulos linfáticos. Adicionalmente, estudos citogenéticos e de imunofenotipagem são úteis no diagnóstico diferencial. (Ver, W. Hiddemann, et al., Mantle Cell Lymphoma pp. 461-476, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); D. Weisenburger, et al., Mantle Cell Lymphoma, pp. 28-41, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

5.5.2.3. LINFOMA DE BURKITT

O Linfoma de Burkitt é um linfoma agressivo das células B tipicamente observado em crianças e adultos jovens e está normalmente associado com doença volumosa da mandíbula e/ou abdômen. Aproximadamente 20% dos pacientes têm envolvimento da medula óssea. Uma forma endêmica de Linfoma de Burkitt envolve infecção por vírus de Epstein-Barr (EBV) das células

malignas; a forma esporádica é independente da infecção pelo EBV. Uma translocação de *c-myc* para locais da imunoglobulina, que resulta na desregulação do gene *c-myc*, é característica desta doença (t(8;14)(q24;q32)). De forma interessante, as deleções das sequências *c-myc* parecem estar envolvidas na forma esporádica da doença, enquanto a forma endêmica normalmente envolve mutações pontuais ou inserções. (Ver, V. Pappa, et al., *Molecular Biology*, pp. 133-157, In *Malignant Lymphoma*, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)). O Linfoma de Burkitt é também caracterizado por SHM, e as células malignas têm um perfil de expressão genética semelhante às células B GC, sugerindo que esta malignidade é derivada das células B GC.

O imunofenótipo do linfoma de Burkitt mostra que as células desta doença expressam CD19, CD20, CD22, e CD79a, mas não CD5, CD23, ciclina D ou desoxinucleotidil-transferase terminal. Frequentemente, estas células são positivas para CD 10 e *BCL6* e normalmente negativas para *BCL2*. (Ver, I. Magrath, et al., *Burkitt's Lymphoma*, pp. 477-501, In *NonHodgkin's Lymphoma*, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

Linfoma do tipo Burkitt das células B de alto grau é um linfoma de fronteira entre o linfoma de Burkitt e o linfoma das células B grandes. As células deste linfoma expressam CD19 e CD20 mas a expressão de CD10, que está quase sempre presente no verdadeiro linfoma de Burkitt, está frequentemente ausente. Por causa disto e de outras características, alguns acreditam que este linfoma deve ser classificado como um linfoma difuso das células B grandes. (Ver, K. MacLennan, *Diffuse Aggressive Cell B Lymphoma*, pp.

49-54, In *Malignant Lymphoma*, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

O diagnóstico do linfoma de Burkitt geralmente baseia-se na detecção da translocação associada a este linfoma; assim, a análise citogenética convencional é normalmente executada. Técnicas de reação em cadeia da polimerase de longa distância e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) têm sido utilizadas para detetar as junções de Ig-myc nas translocações e outras alterações genéticas associadas a esta doença. (Ver, R. Siebert, et al., *Blood* 91:984-990 (1998); T. Denyssevych, et al., *Leukemia*, 16:276-283 (2002)).

5.5.2.4. LINFOMA DIFUSO DAS CÉLULAS B GRANDES (DLBCL)

DLBCL é o linfoma não de Hodgkin mais comum e pode surgir a partir do linfoma das células B pequenas, linfoma folicular ou linfoma da zona marginal. Tipicamente, os pacientes apresentam linfadenopatia; no entanto, uma grande percentagem dos pacientes apresenta-o também em sítios extranodais, com o envolvimento gastrointestinal sendo a mais comum. É observado envolvimento da medula óssea em cerca de 15% dos pacientes. (Ver, Armitage, et al., *Diffuse Large B cell Lymphoma*, pp. 427-453, In *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)). A heterogeneidade nas características clínicas, biológicas e morfológicas torna este grupo de linfomas difícil de subclassificar. No entanto, dois subgrupos distintos foram identificados em que um expressa genes característicos de células B do centro germinativo (GC-DLBCL) e a outra que sobre-expressa genes nas células B do sangue periférico. As taxas de sobrevivência são significativamente melhores para os pacientes com GC-DLBCL do que para aqueles com (ABC)-DLBCL

de tipo células B ativadas. (Ver, W. Chan, Archives of Pathology and Laboratory Medicine 128(12):, 1379-1384 (2004)).

DLBCLs expressa os antígenios da superfície celular CD19, CD20, CD22, e CD79a. CD10 é expressado na grande maioria dos casos e a expressão CD5 é observada em cerca de 10% dos casos. (Ver, K. MacLennan, Diffuse Aggressive Cells B Lymphoma, pp. 49-54, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)). DLBCL é frequentemente marcado por anormalidades de *BCL6* e/ou translocações de *BCL2* para o local IgH. DLBCL de tipo células B GC (GC) caracteriza-se por SHM com genes de imunoglobulina altamente mutados e SHM contínuo em clones malignos com perfil de expressão de gene de células B tipo GC. A maioria dos DLBCL GC foram sujeitos a troca de classe de imunoglobulina. ABC-DLBCL é caracterizado pelo alto nível de expressão dos genes alvo NF-κB incluindo *BCL2*, fator de regulação do interferão 4, *CD44*, *FLIP* e ciclina D. SHM, mas não SHM contínuo, está presente, e ABC-DLBCL não tem um perfil de expressão genética de células B GC. Quase todos ABC-DLBCL expressam um alto nível de IgM.

5.5.2.5. LINFOMA DA ZONA MARGINAL EXTRANODAL

Linfoma da zona marginal extranodal é um linfoma extranodal que ocorre em órgãos normalmente sem tecido linfoide organizado (por exemplo, estômago, glândulas salivares, pulmões e glândulas de tireoide). É em grande parte uma doença que afeta adultos mais velhos com uma média de idade acima de 60 anos. Frequentemente, inflamação crônica ou processos autoimunes precedem o desenvolvimento do linfoma. Linfoma do tecido linfoide associado a mucosa gástrica (MALT), o tipo de linfoma da zona marginal mais comum, está associado com a infecção de *Helicobacter pylori*. Os estudos

mostraram uma resolução dos sintomas com a erradicação da infecção de *H. pylori* no seguimento de um regime de antibióticos. Os sintomas de apresentação para o linfoma MALT gástrico incluem dispepsia não específica, dor epigástrica, náusea, sangramento gastrointestinal e anemia. Sintomas sistémicos são incomuns, assim como níveis elevados de lactato desidrogenase ácido. (Ver, J. Yahalom, et al., Extranodal Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp. 345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); J. Radford, Other Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphomas, pp. 325-330, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000). Sintomas B sistémicos incluem febre superior a 38°C durante mais de 2 semanas sem sinal de infecção, suores noturnos, fadiga extrema ou perda de peso involuntária maior ou igual a 10% do peso corporal ao longo dos últimos 6 meses).

O imunofenótipo de linfoma MALT é caracterizado pela expressão de CD20, CD79a, CD21 e CD35 e sem a expressão de CD5, CD23, e CD10. Cerca de metade dos linfomas MALT expressam CD43. A imunoglobulina tipicamente expressada nas células tumorais desta doença é IgM ao passo que a IgD não é expressada. Estas características são críticas na distinção deste linfoma dos outros linfomas das pequenas células B tais como linfoma de células do manto, linfoma linfocítico e linfoma folicular. A trissomia 3 foi relatada em 60% dos casos de linfoma MALT. Em 25-40% dos linfomas MALT gástrico e pulmonar uma t(11;18) é observada. Esta translocação é observada muito menos frequentemente noutros linfomas MALT. T(11;18) está associada com expressão nuclear de *BCL10*. (Ver, J. Yahalom, et al., Extranodal Marginal Zone B cell Lymphoma of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp. 345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch,

et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)). Os linfomas da zona marginal são geralmente caracterizados por SHM e SHM contínuo.

Procedimentos de diagnósticos incluem imunofenotipagem ou citometria de fluxo para determinar a identidade dos marcadores da superfície celular. Adicionalmente, análise de genética molecular deve ser feita para determinar a presença de t(11;18) dado que este é um indicador de que a doença não vai responder aos antibióticos. Pode ser usada histologia para determinar a presença de *H. pylori*. Testes adicionais devem incluir um hemograma completo, testes bioquímicos básicos incluindo os de ácido láctico desidrogenase; exames CT do abdômen, tórax e pélvis e uma biópsia da medula óssea. (Ver, J. Yahalom, et al., Extranodal Marginal Zone B cell Lymphoma, of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue, pp. 345-360, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

5:5.2.6. LINFOMA DAS CÉLULAS B DA ZONA MARGINAL NODAL

Linfoma das células B da zona marginal nodal é um linfoma classificado relativamente recentemente portanto pouco tem sido publicado sobre ele. É um linfoma das células B nodal primário partilhando características genéticas e morfológicas com os linfomas da zona marginal extranodais e esplénicos, mas não se localizam no baço ou extranodalmente. O vírus da hepatite C foi reportado como estando associado com este linfoma assim como o síndrome de Sjögren. (Ver, F. Berger, et al., Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, pp. 361-365, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

O linfoma da zona marginal nodal tem uma citologia e morfologia heterogénea. Devido à sua proporção relativamente alta de células grandes deste linfoma, contrariamente aos outros linfomas marginais (esplénico e extranodal), não pode ser classificado verdadeiramente como linfoma das células B de baixo grau. O fenótipo genético e imunológico do linfoma da zona marginal nodal inclui a expressão de CD 19, CD20, *BCL2*, sIgM e IgG citoplasmática (cIg). Estas células não expressam CD5, CD10, CD23, CD43 ou ciclina D1. A translocação característica do linfoma MALT, t(11;18), não é observada no linfoma da zona marginal nodal. Estas características ajudam no diagnóstico diferencial deste linfoma de outros linfomas das células B pequenas. (Ver, F. Berger, et al., Nodal Marginal Zone B cell Lymphoma, pp. 361-365, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

5.5.2.7. LINFOMA DA ZONA MARGINAL ESPLÉNICA

O linfoma da zona marginal esplénica é um linfoma indolente micronodular das células B com uma apresentação clínica característica de esplenomegalia proeminente e infiltração do sangue periférico e da medula óssea. Adicionalmente, um nível relativamente alto de envolvimento do fígado tem sido reportado. Um papel para o vírus da hepatite C tem sido postulado para este linfoma. O imunofenótipo do linfoma da zona marginal esplénica é tipicamente CD20⁺, IgD⁺, *BCL2*⁺, p27⁺, CD3⁻, CD5⁻, CD10⁻, CD23⁻, CD38⁻, CD43⁻, *BCL-6*⁻, e ciclina D1⁻. As características genéticas incluem uma deleção 7q, alterações p53 e SHM. (Ver, M. Piris, et al., Splenic Marginal Zone Lymphoma, pp. 275-282, In Non-

Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

O diagnóstico geralmente assenta na imunofenotipagem para determinar a identidade dos marcadores da superfície celular. A análise genética e bioquímica, em combinação com dados dos marcadores da superfície celular, ajudam a diferenciar este linfoma de outros linfomas das células B pequenas. (Ver, M. Piris, et al., Splenic Marginal Zone Lymphoma, pp. 275-282, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

5.5.2.8. LEUCEMIA LINFOCÍTICA (CÉLULA B) AGUDA (ALL)

ALL é uma neoplasia à base de medula que afeta largamente crianças com a incidência mais alta entre 1-5 anos. Os sintomas de apresentação mais comuns incluem fadiga, letargia, febre e dor óssea e articular. A fadiga e a letargia correlacionam-se com o grau de anemia presente. Uma contagem elevada de glóbulos brancos é comum na apresentação. As radiografias do tórax frequentemente mostram lesões esqueléticas. A propagação extramedular é comum e envolve o sistema nervoso central, testículos, nódulos linfáticos, fígado, baço e rim. Massas mediastínicas anteriores são observadas somente em cerca de 5-10% de novos casos diagnosticados. (Ver, J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pp. 2241-2271, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

O imunofenótipo de ALL é CD10⁺, CD19⁺, CD26⁺, e CD24⁺. Células de ALL de pré-células B expressam imunoglobulina citoplasmática mas não de superfície, enquanto ALL de células B maduras (as quais contam somente para 1-2% dos

casos de ALL) distinguem-se das outras leucemias da linhagem das células B através da expressão de imunoglobulina de superfície. As características genéticas de ALL incluem t(8;14), t(2;8) e t(8;22). Embora raramente detetadas ao nível citogenético t(12;21) pode ser a anomalia citogenética mais comumente associada a ALL da infância (observada em cerca de 25% dos casos). (Ver, M. Kinney, et al., Classification and Differentiation of the Acute Leukemias, pp. 2209-2240, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999); J Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pp. 2241-2271; In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, (1999)).

O diagnóstico exato de leucemia aguda normalmente assenta num aspirado e biópsia do osso. Esfregaços de aspirado são usados para as avaliações morfológicas, imunológicas e citológicas. A demonstração de linfoblastos na medula óssea é diagnóstico de ALL. A presença de mais de 5% de células de linfoblastos leucémicos na medula óssea confirma o diagnóstico de ALL mas não requer mais de 25% para diagnóstico definitivo. As punções lombares são utilizadas para diagnosticar o envolvimento do sistema nervoso central. Níveis de ácidos úricos séricos e níveis de lactato desidrogenase séricos têm sido encontrados como sendo elevados em ALL. (Ver, M. Kinney, et al., Classification e Differentiation of the Acute Leukemias, pp. 2209-2240, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999); J. Whitlock, et al., Acute Lymphocytic Leukemia, pp. 2241-2271; In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee, et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, (1999)).

5.5.2.9. LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (CLL)/LINFOMA LINFOCÍTICO DAS CÉLULAS B PEQUENAS (SLL)

CLL/SLL é o tipo mais comum de leucemia. Quando a doença envolve o sangue periférico e a medula óssea então é referido como CLL. No entanto, quando os nódulos linfáticos e outros tecidos são infiltrados pelas células que são imunológica e morfológicamente idênticas às de CLL, mas quando as características leucémicas da doença estão ausentes, então a doença é referida como SLL. Esta doença aflige na maior parte idosos com a incidência da doença ocorrendo mais em homens do que em mulheres. A linfadenopatia indolor é o achado mais comum na apresentação. Hipogamaglobulinémia é comum com a maioria dos casos de CLL/SLL exibindo níveis reduzidos de todas as imunoglobulinas em vez de qualquer subclasse particular de imunoglobulinas. Pacientes assintomáticos são frequentemente diagnosticados durante análises sanguíneas de rotina (contagem de linfócitos acima de $5000 \times 10^9/L$). Até 20% dos casos de CLL/SLL reportam sintomas B. Uma característica adicional de diagnóstico é infiltração da medula óssea em mais de 30% por linfócitos imaturos. As biópsias dos nódulos linfáticos geralmente mostram infiltração dos nódulos envolvidos com linfócitos bem diferenciados. Fenómenos autoimunes estão frequentemente associados a CLL/SLL incluindo anemia hemolítica autoimune e trombocitopenia imune. (Ver, J. Gribben, et al., Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pp. 243-261, In NonHodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. Maclennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000); Clinical Oncology, A.

Neal, et al., Neal, Hoskin e Oxford University Press, co-publ., Nova Iorque, NI (2003)).

Contrariamente à maioria das malignidades das células B de baixo grau, translocações recíprocas não aleatórias são raramente encontradas em CLL/SLL. No entanto, outras anomalias citogenéticas têm sido relatadas incluindo deleções em 13q14, 11q22-23 e 17q13, com os dois últimos envolvendo o local p53. Aproximadamente 20% dos casos exibem trissomia 12. Um elevado nível de microglobulina β -2, níveis mais altos de expressão de CD38 e a produção de fator de necrose tumoral alfa são todos característicos de CLL/SLL. O imunofenótipo de CLL/SLL é muito diagnóstico e inclui fraca expressão da imunoglobulina de superfície normalmente IgM, ou IgM e IgG, assim como expressão dos antígenos celulares CD19, CD20 e normalmente CD5 e CD23. (Ver, J. Gribben, et al., Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

5.5.2.10. LEUCEMIA PROLINFOCÍTICA DAS CÉLULAS B (PLL)

PLL, uma vez considerada uma variante de CLL, é agora entendida como sendo uma doença distinta. PLL é geralmente uma doença dos homens idosos e é caracterizada por uma contagem muito alta de glóbulos brancos (superior a $200 \times 10^9/L$) e esplenomegalia. Sintomas adicionais incluem anemia e trombocitopenia. Os pró-linfócitos em PLL compreendem mais de 55% das células no sangue e medula óssea. Em contraste com CLL, fenômenos autoimunes são

raramente observados em PLL. (Ver, J. Gribben, et al.,, Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Prolymphocytic Leukemia, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

O imunofenótipo de PLL é caracterizado pela expressão de CD19, CD21, CD22, CD24 e FMC7. As células de PLL não expressam CD23 e a maior parte não expressa CD5. As células PLL exibem anomalias cromossômicas complexas, com deleções em 13q14 e 11q23 sendo algumas das mais frequentes. O padrão de mutação p53 nas células PLL é diferente do observado para CLL. O diagnóstico diferencial normalmente assenta no hemograma completo, análises histológicas, imunofenotípicas, e genéticas. (Ver, J. Gribben, et al.,, Small B cell Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and, pp. 243-261, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

5.5.2.11 LEUCEMIA DE CÉLULAS PILOSAS (HCL)

HCL é uma leucemia crônica indolente, rara, que afeta mais homens que mulheres e em grande parte, os de meia-idade. Os sintomas típicos incluem esplenomegalia e pancitopenia massiva. O sangue periférico e a medula óssea contêm as típicas "células pilosas," as quais são linfócitos B com projeções citoplasmáticas. Mais de 90% dos pacientes de HCL apresentam infiltração da medula óssea. (Ver, Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin e Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003); J. Johnston, Hairy Cell Leukemia, pp. 2428-2446, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

A análise citogénica tem mostrado que as anomalias clonais estão presentes em 19% dos casos e envolvem anomalias numéricas e estruturais dos cromossomas 5, 7 e 14. O nível sérico de TNF- α é elevado na leucemia de células pilosas e correlaciona-se com a carga tumoral. Na leucemia de células pilosas as células expressam imunoglobulina de superfícies (IgG e IgM) e CD11c, CD19, CD20, CD22 e tipicamente CD25. Adicionalmente, FMC7, HC-2 e CD103 são expressas. Células HCL não expressam CD5 ou CD10. O diagnóstico geralmente envolve o uso de aspirados de medula óssea, citogenética, esfregaços sanguíneos e imunofenotipagem. (Ver, Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin e Oxford University Press, co-publ., New York, NY (2003); J. Johnston, Hairy Cell Leukemia, pp. 2428-2446, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

5.5.2.12. LINFOMA LINFOBLÁSTICO DAS CÉLULAS B PRECURSORAS/ LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DAS PRÉ-CÉLULAS B /LINFOMA LINFOBLÁSTICO

Linfoma linfoblástico das células B precursoras/ leucemia linfoblástica aguda das pré-células B /linfoma linfoblástico é uma doença das células T ou B precursoras. Os linfomas linfoblásticos das células T e B são morfológicamente idênticos, mas distinções clínicas podem ser feitas com base no grau da infiltração da medula óssea ou envolvimento da medula óssea. 85-90% dos linfomas linfoblásticos derivam da célula T com os restantes sendo derivados das células B. O linfoma linfoblástico tem uma média de idade de 20 anos com uma predominância masculina. O envolvimento dos nódulos linfáticos periféricos é uma característica comum na apresentação, ocorrendo especialmente nas regiões cervicais, supraclavicular e

axilar. Esta doença frequentemente apresenta-se com envolvimento da medula óssea. O sistema nervoso central é menos comum na apresentação mas frequentemente aparece em casos de recidiva. Outros sítios de envolvimento podem incluir fígado, baço, osso, pele, faringe e testículos (Ver, J. Sweetenham, et al., Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, pp. 503-513, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

Linfomas linfoblásticos das células B precursoras expressam marcadores de células B imaturas marcadoras tais como CD99, CD34 e desoxinucleotidil-transferase terminal. Estas células também expressam CD79a, CD19, e por vezes CD20 e tipicamente sem a expressão de CD45 e imunoglobulina de superfície. Translocações em 11q23, assim como t(9;22)(q34;q11.2) e t(12;21)(p13;q22), têm sido associadas a um mau prognóstico. Um bom prognóstico está associado a cariótipo hiperdiploide, especialmente o associado a trissomia 4, 10, e 17 e t(12;21)(p13;q22). (Ver, J. Sweetenham, et al., Precursor B- and T-Cell Lymphoblastic Lymphoma, pp. 503-513, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA (2004)).

Testes de diagnóstico incluem biópsias dos nódulos linfáticos, análises sanguíneas, raios X, tomografias computadorizadas, e punções lombares para examinar o fluido cerebrospinal quanto às células malignas.

5.5.2.13. LINFOMA PRIMÁRIO MEDIASTÍNICO DAS CÉLULAS B GRANDES

O linfoma primário mediastínico das células B grandes é um linfoma difuso das células B grandes que ocorre

predominantemente em mulheres jovens e caracterizado por uma massa mediastínica anterior localmente invasiva que tem origem no timo. A dispersão distante para os nódulos periféricos e o envolvimento da medula óssea não é usual. Sintomas sistémicos são comuns. Enquanto esta doença se assemelha aos linfomas nodais das células grandes, tem características genéticas, imunológicas, e morfológicas distintas.

O imunofenótipo das células tumorais do linfoma primário mediastínico das células B grandes são frequentemente negativos para imunoglobulina de superfície mas expressam esses antígenos associados a células B como CD 19, CD20, CD22, e CD79a. CD10 e *BCL6* são também comumente expressos. A expressão dos marcadores associados a células plasmáticas CD15, CD30, antígeno de membrana epitelial (EMA) é raro. Arranjos dos genes *BCL6* e *c-myc* são também incomuns. A presença de rearranjos de imunoglobulina clonal, região variável de imunoglobulina e hipermutação de gene em conjunto com hipermutação de *BCL6* sugere que este linfoma deriva de células B de um centro germinativo maduro ou centro pós-germinativo. As translocações cromossómicas que parecem estar associadas com tumores desta doença são semelhantes às observadas noutras formas de linfoma difuso das células grandes. (Ver, P. Zinzani, et al., Primary Mediastinal Large B cell Lymphoma, pp. 455-460, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA (2004)).

A avaliação diagnóstica para o linfoma primário mediastínico das células B grandes geralmente inclui um exame físico completo, análise hematológica e bioquímica completa, tomografia computadorizada corporal total e biópsia da medula óssea. Cintilografia com gálio-67 é um

teste útil para avaliação do estágio, resposta ao tratamento e de recidiva. (Ver, P. Zinzani et al., Primary Mediastinal Large B cell Lymphoma, pp. 455-460, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA (2004)).

5.5.2.14. LINFOMA LINFOPLASMOCÍTICO (LPL)/IMUNOCITOMA LINFOPLASMOCÍTICO/MACROGLOBULINÉMIA DE WALDSTRÖM

LPL/Imunocitoma linfoplasmocítico/ Macroglobulinémia de Waldström é um linfoma nodal que é normalmente indolente, e frequentemente envolve a medula óssea, nódulos linfáticos e baço. Isto é geralmente uma doença de adultos mais velhos com o sexo masculino predominando ligeiramente. A maioria dos pacientes tem paraproteína IgM monoclonal no seu soro (>3g/dL) resultando em hiperviscosidade do soro. As células tumorais têm uma morfologia plasmocítica. Um subconjunto de LPL é caracterizado por translocações recorrentes entre os cromossomas 9 e 14, as quais envolvem os locais PAX5 e da cadeia pesada de imunoglobulina. LPL caracteriza-se por SHM assim como SHM contínuo, e acredita-se ser derivado de células B pós-GC. (Ver, A. Rohatiner, et al., Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp. 263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000); A. Lal, et al., Role of Fine Needle Aspiration in Lymphoma, pp. 181-220, In W. Finn, et al., eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

O imunofenótipo desta doença mostra expressão dos antigénios associados às células B CD19, CD20, CD22, e

CD79a e a falta da expressão de CD5, CD10, e CD23. A presença de imunoglobulina de superfície forte e CD20, a falta de expressão de CD5, e CD23 e a presença de imunoglobulina citoplasmática são características que ajudam a distinguir esta doença da leucemia linfocítica crônica. Também diagnóstico desta doença é t(9;14)(p13;q32). (Ver, A. Rohatiner, et al., Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp. 263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004); K. MacLennan, Diffuse Indolent B cell Neoplasms, pp. 43-47, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000); R. Chaganti, et al., Cytogenetics of Lymphoma, pp. 809-824, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2004)).

Testes de diagnóstico tipicamente incluem um hemograma completo, testes da função renal e hepática, tomografias computadorizadas, biópsia e aspiração da medula óssea, eletroforese de proteína para quantificar e caracterizar a paraproteína e viscosidade sérica. A medição da β 2-microglobulina é usada como um teste de prognóstico. (Ver, A. Rohatiner, et al., Lymphoplasmacytic Lymphoma and Waldström's Macroglobulinemia, pp. 263-273, In Non-Hodgkin's Lymphomas, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA (2004)).

5.5.2.15. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE TIPO NULL

A leucemia linfoblástica aguda de tipo Null é um subconjunto de ALL que não tem características de células B ou T. A análise fenotípica de blastos leucêmicos mostra um padrão de ALL nulo típico, isto é, CD10 (antigénio ALL

comum)-negativo, forte HLA-DR-positivo, e CD19 (B4)-positivo (ver Katz et al. (1988) Blood 71(5):1438-47).

5.5.2.16. LINFOMA DE HODGKIN

O linfoma de Hodgkin normalmente surge nos nódulos linfáticos de adultos jovens. Pode ser dividido em subtipos clássicos e um subtipo predominante linfocítico nodular menos comum. O tipo clássico exibe SHM, mas não SHM contínuo, e não tem um perfil de expressão de genes de células B GC. O tipo linfócito nodular predominante, em contraste, é caracterizado pelo SHM e SHM contínuo e um perfil de expressão de genes das células B GC. Enquanto os dois tipos diferem clínica e biologicamente, estes partilham certas características tais como a falta de células neoplásicas num fundo de células inflamatórias benignas. B. Schnitzer et al., Hodgkin Lymphoma, pp. 259-290, In W. Finn e L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

As características mais comuns na apresentação são o aumento indolor dos nódulos linfáticos, normalmente no pescoço, mas ocasionalmente na região inguinal. O aumento e diminuição de nódulos é também característico desta doença. Os sintomas de B são observados em cerca de um terço dos pacientes. O envolvimento extranodal isolado é raro e em casos em que ocorreu disseminação é observado envolvimento extranodal em cerca de 10-20% das vezes. (Ver, P. Johnson et al., Hodgkin's Disease: Clinical Features, pp. 181-204, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000)).

As células Reed-Sternberg (RS) são as células malignas do linfoma de Hodgkin. As células RS e suas variantes expressam CD15, CD25, CD30 e recetor de transferrina.

Adicionalmente estas células expressam imunoglobulina citoplasmática policlonal. Na maioria dos casos de linfoma de Hodgkin as células RS não expressam CD45, uma característica que ajuda a distinguir esta doença do linfoma não de Hodgkins. Foi demonstrado que o vírus de Epstein Barr está presente em células Reed-Sternberg em cerca de metade dos casos de linfoma de Hodgkin mas o seu papel não é claro.

O diagnóstico é muito frequentemente feito através de biópsia de nódulos linfáticos. Testes de diagnóstico adicionais incluem um hemograma completo (frequentemente os testes hematológicos são normais; contagens de glóbulos brancos do sangue inferiores a $1,0 \times 10^9/L$ são vistas em cerca de 20% dos casos), taxa de sedimentação de eritrócitos (frequentemente elevada em estádios avançados da doença), testes bioquímicos incluindo eletrólitos, ureia, creatinina, urato, cálcio (hipercalcémia é rara mas quando presente está associada a envolvimento extensivo do osso), testes sanguíneos hepáticos, lactato desidrogenase (níveis elevados frequentemente associados a doença avançada), albumina e beta₂-microglobulina (β_2 -M). Linfangiogramas e radiografia do tórax e tomografias computadorizadas do tórax, abdómen e pélvis são importantes na identificação de nódulos linfáticos anormais e da extensão do envolvimento extranodal. Biópsias de medula óssea são tipicamente consideradas opcionais dado que o envolvimento da medula óssea não é frequente e os resultados dessas biópsias parecem não afetar a gestão clínica ou o prognóstico. Esplenectomias não são normalmente realizadas hoje em dia dado que raramente influenciam a gestão e as imagens de CT ou MRI fornecem informação do estado do baço. Níveis significativamente elevados de p55, TNF e sICAM-1 são correlacionados com o estágio de doença, presença de sintomas e taxa de resposta

completa. (Ver, P. Johnson, et al., Hodgkin's Disease: Clinical Features, pp. 181-204, In Malignant Lymphoma, B. Hancock, et al., eds., Oxford University Press, Nova Iorque, N.I. (2000); Clinical Oncology, A. Neal, et al., Neal, Hoskin e Oxford University Press, co-publ., Nova Iorque, NI (2003); R. Stein, Hodgkin's Disease, pp. 2538-2571, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

5.5.2.17. MIELOMA MÚLTIPLO

O mieloma múltiplo é uma doença maligna das células plasmáticas. As células neoplásicas estão localizadas na medula óssea, e lesões ósseas osteolíticas são características. Acredita-se que translocações cromossômicas recíprocas entre um dos locais de imunoglobulina e uma variedade de outros genes, por exemplo, ciclina D1, ciclina D3, c-MAF, MMSET (proteína de domínio SET do mieloma múltiplo) ou recetor 3 do fator de crescimento de fibroblastos são os eventos oncogénicos primários. O mieloma múltiplo é caracterizado por SHM, e a célula putativa de origem é uma célula B pós GC. O mieloma múltiplo é tipicamente identificado primeiramente por sintomas tais como infeção recorrente, fadiga, dor, e problemas renais e é confirmado com testes clínicos (ver, por exemplo, Cancer: Principles and Practice of Oncology. 6ª edição. DeVita, V.T., Hellman, S. e Rosenberg, S. A. editors. 2001 Lippincott Williams e Wilkins Filadélfia, PA 1910.6 pp. 2465-2499).

Pacientes que são candidatos para tratamento pelas composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção podem ser sujeitos a outros testes de diagnóstico ao sangue e/ou urina para confirmar o diagnóstico ou suspeição de mieloma múltiplo incluindo, mas não se limitando a, testes

de hemograma completo (CBC) para determinar se os tipos de células reportadas num CBC estão dentro das suas gamas normais que são bem conhecidas na técnica, o perfil químico do sangue para determinar se os níveis dos vários componentes sanguíneos, tais como albumina, azoto ureico do sangue (BUN), cálcio, creatinina, e lactato desidrogenase (LDH), se desviam dos valores padrão. Níveis séricos de beta₂-microglobulina (β₂-M) podem também ser examinados, e marcadores substitutos para IL-6, um fator de crescimento para células de mieloma. A análise da urina pode ser utilizada para medir os níveis de proteína na urina. Eletroforese pode ser usada para medir os níveis de várias proteínas, incluindo proteína M no sangue (chamada eletroforese de proteínas séricas, ou SPEP) ou urina (chamada eletroforese da urina, ou UEP). Um teste adicional, chamado eletroforese de imunofixação (IFE) ou imunoeletroforese, pode também ser realizado para fornecer mais informação específica acerca do tipo de proteínas de anticorpo anormais presentes. Avaliar as alterações e proporções das várias proteínas, particularmente proteína M, pode ser usada para identificar a progressão da doença de mieloma e a resposta aos regimes de tratamento. O mieloma múltiplo é caracterizado por um grande aumento na proteína M que é secretada pelas células tumorais do mieloma.

Testes de diagnóstico no osso podem também ser realizados para confirmar o diagnóstico ou suspeita de mieloma múltiplo incluindo, mas não se limitando a, raios X e outros testes imagiológicos - incluindo uma análise do osso (esqueleto), imagem de ressonância magnética (MRI), e tomografia axial computadorizada (CAT), também conhecida como tomografia computadorizada (CT) podem avaliar alterações na estrutura óssea e determinar o número e tamanho de tumores no osso. Aspiração de medula óssea ou biópsia da medula

óssea podem ser usados para detetar um aumento no número de células plasmáticas na medula óssea. A aspiração requer uma amostra de medula óssea líquida, e a biópsia requer uma amostra de tecido ósseo sólido. Em ambos os testes, as amostras são preferencialmente recolhidas da pélvis (osso da anca). O esterno (osso do tórax) pode também ser usado para aspiração de medula óssea.

Pacientes com mieloma múltiplo são tipicamente categorizados nos seguintes três grupos que ajudam a definir regimes de tratamento eficazes. Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) é tipicamente caracterizada por um nível sérico de proteína M inferior a 3 g/dL, células plasmáticas clonais de medula óssea inferiores a 10%, sem evidência de outros distúrbios das células B, e sem danos de órgãos ou tecidos relacionados, tais como hipercalcemia (níveis séricos de cálcio aumentados), função renal afetada identificada por creatinina sérica aumentada, anemia, ou lesões ósseas. Mielomas assintomáticos são tipicamente de estágio I e incluem mieloma múltiplo latente (SMM) e mieloma múltiplo indolente (IMM). SMM é caracterizado por proteína M sérica superior ou igual a 3 g/dL e IMM é caracterizado por células plasmáticas clonais de medula óssea superiores ou iguais a 10% de células de medula óssea. Mieloma sintomático é caracterizado por proteína M no soro e/ou urina e inclui mieloma múltiplo de estágio II caracterizado pela presença de células plasmáticas clonais de medula óssea ou plasmocitoma e o mieloma múltiplo de Estádio III é caracterizado por danos em órgãos ou tecidos relacionados.

Mieloma osteoclerótico é um componente do síndrome raro POEMS (polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, gamopatia monoclonal e lesões da pele). O pico de incidência é aos 40 até 50 anos de idade. Características

sistêmicas incluem lesões esqueléticas, células plasmáticas-medula < 5%, CBC normal, plaquetas aumentadas, e organomegalia. O CSF tem proteína elevada sem células presentes. Os níveis de proteína M são baixos (< 3g/dL, mediana = 1,1 g/dL); classe de cadeia pesada - normalmente α ou γ ; classe de cadeia leve -normalmente λ ; raras urinas monoclonais e crioglobulinemia ocasional. Neuropatia ocorre em 50% dos pacientes com fraqueza proximal e distal, a perda sensorial é maior em fibras maiores do que em fibras menores; e desmielinização e latência distal longa.

Pacientes de mieloma múltiplo latente geralmente apresentam doença estável durante meses/anos; sem anemia, lesões ósseas, insuficiência renal ou hipercalcemia; têm >10% de células plasmáticas na medula óssea e proteína sérica monoclonal. Os critérios para mieloma múltiplo latente são compatíveis com o diagnóstico de mieloma múltiplo; no entanto, não há evidência de curso progressivo. Estes são casos com uma progressão lenta, a massa de células tumorais é pequena ao diagnóstico e a percentagem de células plasmáticas da medula óssea na fase S é baixa (<0,5%). Características clínicas comuns incluem: níveis de proteína M sérica >3 g/dL e/ou células plasmáticas de medula óssea $\geq 10\%$; ausência de anemia, insuficiência renal, hipercalcemia, lesões ósseas líticas.

Mieloma múltiplo indolente (ou assintomático) é um mieloma múltiplo diagnosticado por acaso na ausência de sintomas, normalmente após estudos de análise laboratorial. Mieloma múltiplo indolente é semelhante a mieloma latente mas com menos lesões ósseas e anemia moderada. A maior parte dos casos de mieloma múltiplo indolente desenvolve mieloma múltiplo aberto dentro de 3 anos. Os critérios de diagnóstico são os mesmos que para mieloma múltiplo exceto: não há lesões ósseas ou uma lesão lítica assintomática

(análise de raio-X); nível de componente M <3 g/dL para IgG, 2 g/dL para IgA cadeia leve na urina < 4 g/24h; hemoglobina > 10 g/dL, cálcio sérico normal, creatinina sérica <2 mg/dL, e sem infecções.

5.5.2.18. PLASMOCITOMA SOLITÁRIO

Plasmocitoma solitário é um de um espectro de neoplasmas de células plasmáticas que variam desde gamopatia monoclonal benigna até plasmocitoma solitário e até mieloma múltiplo. Aproximadamente setenta por cento de todos os casos de plasmocitoma solitário eventualmente resultam em mieloma múltiplo. Estas doenças são caracterizadas pela proliferação de células B que produzem a paraproteína característica. O plasmocitoma solitário resulta numa proliferação de células plasmáticas clonais num local solitário, normalmente um único sítio do osso ou tecido extramedular. Os critérios de diagnóstico de plasmocitoma solitário incluem uma única lesão confirmada histologicamente, biópsia óssea normal, análise negativa ao esqueleto, sem anemia, cálcio e função renal normais. A maior parte dos casos apresenta proteína M sérica minimamente elevada (paraproteína). A idade mediana ao diagnóstico é 50-55, cerca de 5-10 anos antes da idade mediana para mieloma múltiplo. (Ver, C. Wilson, *The Plasma Cell Dyscrasias*, pp. 113-144, In W Finn e L. Peterson, eds., *Hematopathology in Oncology*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004), S. Chaganti, et al., *Cytogenetics of Lymphoma*, pp. 809-824, In *Non-Hodgkin's Lymphomas*, P. Mauch, et al., eds., Lippincott Williams & Wilkins, Filadélfia, PA, (2004)).

As características imunofenotípicas e genéticas do plasmocitoma parecem ser semelhantes ao mieloma múltiplo.

5.5.2.19. DOENÇA DA CADEIA LEVE/ DOENÇA DE DEPOSIÇÃO DA LEVE CADEIA (LCDD)

LCDD é um distúrbio de discrasias das células plasmáticas causado pela excessiva síntese de cadeias leves de imunoglobulina (normalmente cadeias leves kapa) que são depositadas em tecidos. Pacientes frequentemente apresentam disfunção de órgãos, fraqueza, fadiga e perda de peso. Em aproximadamente 80% dos casos de LCDD uma imunoglobulina monoclonal é detetada. A detecção de cadeias leves kapa monoclonais usando técnicas de imunofluorescência é limitada pela tendência das cadeias leves de originar coloração de fundo excessiva, e portanto, marcação ultraestrutural imuno-ouro ("immunogold") pode ser necessária. (Ver, C. Wilson, The Plasma Cell Dycrasias; pp. 113-144, In W. Finn e L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA (2004)).

5.5.2.20. LEUCEMIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS (PCL),

PCL, uma discrasia das células plasmáticas, é uma variante agressiva rara de mieloma múltiplo. O critério para leucemia das células plasmáticas é uma contagem absoluta de células plasmáticas no sangue periférico superior a $2 \times 10^9/L$ ou células plasmáticas superiores a 20% dos glóbulos brancos. A determinação da presença de uma população de CD138+ com restrição da cadeia leve citoplasmática por citometria de fluxo vai distinguir PCL de neoplasia linfoide com características plasmocíticas. As células PCL são também caracterizadas pela falta de cadeia leve de superfície e expressão de CD 19, e sem ou com fraca expressão de CD45. Cerca de 50 % dos casos de PCL expressam CD20 e cerca de 50% não têm expressão de CD56. As anomalias genéticas observadas em pacientes de PCL são as mesmas que as observadas para pacientes de mieloma múltiplo mas são

encontradas com maior frequência em PCL. (Ver, C. Wilson, The Plasma Cell Dyscrasias, pp. 113-144, In W. Finn e L. Peterson, eds., Hematopathology in Oncology, Kluwer Academic Publishers, Norwell, MA, (2004)).

A leucemia das células plasmáticas tem duas formas: se o diagnóstico inicial for baseado na fase leucêmica do mieloma então a forma primária está presente, caso contrário é a secundária. A leucemia primária das células plasmáticas está associada a uma idade mais jovem, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, e menos lesões ósseas líticas mas um prognóstico pior do que a forma secundária. O sangue periférico dos pacientes de leucemia das células plasmáticas tem mais de 20% de células plasmáticas com contagem absoluta de 2000/mL ou mais.

5.5.2.21. GAMOPATIA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO DESCONHECIDO (MGUS)

MGUS é uma condição relativamente comum caracterizada pela presença de imunoglobulinas eletroforeticamente homogêneas ou componentes M benignos. A ocorrência desta condição parece aumentar com a idade. A maior parte dos indivíduos portadores de componentes M nunca desenvolve discrasias das células plasmáticas malignas, tais como mieloma múltiplo. No entanto, alguns indivíduos com esta condição têm condições malignas associadas. Quando sintomático, os pacientes podem ter fígado ou baço aumentados e pieuroneuropatia. (Ver, J. Foerster, Plasma Cell Dyscrasias: General Considerations, pp. 2612-2630, In Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).

MGUS pode ser diferenciado de mieloma múltiplo pela presença de um número aumentado de células plasmáticas

monoclonais circulantes no sangue periférico. As características sorológicas dos componentes M são idênticas a outras condições de discrasias das células plasmáticas, no entanto, a concentração total de componente M é normalmente inferior a 30 g/L. A paraproteína é normalmente IgG; no entanto múltiplas paraproteínas podem estar presentes incluindo IgG, IgA, IgM. A quantidade relativa de cada uma das classes de imunoglobulinas individuais é tipicamente proporcional à encontrada no soro normal. Proteinémia ou proteinúria é rara. Medições seriadas dos níveis de proteína M no sangue e na urina, e monitorização continuada das características clínicas e laboratoriais (incluindo eletroforese de proteína) é o método mais fiável de diferenciar MGUS de estádios precoces de discrasias das células plasmáticas. *Em Wintrobe's Clinical Hematology, Décima Edição, G. Lee et al., eds. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1999)).*

5.5.2.22. MALIGNIDADES DAS CÉLULAS B MADURAS:

Os investigadores mostraram que as composições de anti-CD19 inventivas podem depletar células B maduras. Assim, como outro aspeto, a invenção pode ser praticada para tratar malignidades das células B maduras, incluindo mas não se limitando a linfoma folicular, linfoma das células do mantos, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, linfoma difuso das células B grandes (DLBCL) incluindo, DLBCL de células tipo B de centro germinativo (GCB), DLBCL de células tipo B ativadas (ABC), e DLBCL de tipo 3, linfoma de Hodgkin incluindo tipo pré-dominante de linfócito clássico e nodular, linfoma linfoplasmático (LPL), linfoma da zona marginal incluindo linfoma do tecido linfoide associado a mucosa gástrica (MALT), e leucemia linfocítica crónica (CLL) incluindo CLL de imunoglobulinas mutadas e CLL de imunoglobulinas não mutadas.

5.5.2.23. MALIGNIDADES DAS PRÉ-CÉLULAS B:

Além disso, CD 19 é expresso mais precocemente no desenvolvimento das células B do que, por exemplo, CD20, e é, portanto, particularmente adequado para o tratamento de malignidades de pré-células B e de células B imaturas, por exemplo, na medula óssea. Malignidades de pré-células B e de células B imaturas representativas incluem mas não são limitadas a linfoma de células do manto, leucemia linfoblástica aguda de pré-células B, leucemia linfoblástica das células B precursoras, e outras malignidades caracterizadas pela expressão de CD 19.

5.5.3. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DE CD19 NUMA AMOSTRA OU INDIVÍDUO

Embora não sejam necessárias, análises da densidade de CD 19 podem ser empregues para caracterizar adicionalmente o diagnóstico do paciente. Métodos para determinar a densidade do anticorpo que se liga a células são conhecidos dos especialistas na técnica (Ver, por exemplo, Sato et al., J. Immunology 165:6635-6643 (2000); que divulgam um método para avaliar a densidade à superfície da célula de antígenos CD específicos). Outros métodos padrão incluem análise Scatchard. Por exemplo, o anticorpo ou fragmento pode ser isolado, radiomarcado, e a atividade específica do anticorpo radiomarcado determinada. O anticorpo contacta depois com uma célula alvo expressando CD19. A radioatividade associada à célula pode ser medida e, com base na atividade específica, a quantidade de anticorpo ou fragmento de anticorpo ligada à célula determinada. Alternativamente, análise de seleção de células por fluorescência ativada (FACS) pode ser empregue. Geralmente, o anticorpo ou fragmento de anticorpo é ligado a uma célula

alvo expressando CD19. Um segundo reagente que se liga ao anticorpo é depois adicionado, por exemplo, um anticorpo anti-imunoglobulina marcado com flourocromo. A coloração com flourocromo pode depois ser medida e usada para determinar a densidade do anticorpo ou fragmento de anticorpo que se liga à célula.

Como outro método adequado, o anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser marcado diretamente com um marcador detetável, tal como um fluoróforo, e ligado a uma célula alvo. A proporção de marcador para proteína é determinada e comparada com esferas padrão com quantidades conhecidas de marcador ligadas a si. Comparação da quantidade de marcador ligado à célula com os padrões conhecidos pode ser usada para calcular a quantidade de anticorpo ligado à célula.

A presente invenção fornece um método para detetar *in vitro* ou *in vivo* a presença e/ou densidade de CD 19 numa amostra ou indivíduo. Isto pode também ser útil para monitorizar a doença e afetar o tratamento e para determinar e ajustar a dose de anticorpo a ser administrada. O método *in vivo* pode ser realizado usando técnicas imagiológicas tais como PET (tomografia de emissão de positrão) ou SPECT (tomografia computadorizada de emissão de fotão simples). Alternativamente, pode marcar-se o anticorpo anti-CD19 com Índio usando um quelante ligado covalentemente. O anticorpo resultante pode ser visualizado usando câmaras gama padrão do mesmo modo que ZEVALIN™ (mAb anti-CD20 marcado com Índio) (Biogen Idec) é usado para visualizar antigénio CD20.

O método *in vivo* pode ser realizado contactando uma amostra a ser testada, opcionalmente ao mesmo tempo que uma amostra de controlo, com um anticorpo anti-CD19 humano da invenção

sob condições que permitem a formação de um complexo entre um anticorpo da invenção e o antigénio CD 19 humano. A formação do complexo é depois detetada (por exemplo, usando uma análise FACS ou "Western blotting"). Quando se usa uma amostra de controlo ao mesmo tempo que a amostra de teste, um complexo é detetado em ambas as amostras e qualquer diferença estatisticamente significativa na formação de complexos entre as amostras é indicativa da presença de CD 19 humano na amostra de teste.

A intensidade de fluorescência média pode ser usada como medida da densidade de CD 19. As células B podem ser removidas de um paciente e coradas com anticorpos CD 19 que foram marcados com um marcador fluorescente e a intensidade da fluorescência é medida usando citometria de fluxo. As intensidades de fluorescência podem ser medidas e expressas como a média de intensidade por células B. Usando esses métodos, intensidades de fluorescência média que são representativas da densidade de CDC 19 podem ser comparadas para um paciente antes e depois do tratamento usando os métodos e composições da invenção, ou entre níveis normais de hCD 19 em células B e de pacientes.

Em pacientes em que a densidade da expressão de CD 19 em células B foi determinada, a densidade de CD 19 pode influenciar a determinação e/ou ajustamento da dosagem e/ou regime de tratamento usado com o anticorpo anti-CD19 das composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção. Por exemplo, quando a densidade de CD19 é alta, pode ser possível usar anticorpos anti-CD19 que medeiam menos eficazmente ADCC em humanos. Quando o paciente tratado usando as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção tem uma baixa densidade de CD 19, podem ser usadas doses maiores do anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção. Quando o paciente tratado

usando as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção tem baixa densidade de CD 19, uma dose mais baixa do anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção pode ser usada. Quando o paciente tratado usando as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção tem uma alta densidade de CD 19, uma dose menor do anticorpo anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção pode ser usada. A densidade de CD 19 pode ser comparada com a densidade de CD20 num paciente, a densidade de CD 19 pode ser comparada com a média de densidade de CD 19 para humanos ou para uma determinada população de pacientes, ou a densidade de CD19 pode ser comparada com os níveis de CD 19 no paciente antes do tratamento ou antes do início da doença ou distúrbio das células B. O paciente tratado usando as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção pode ter uma malignidade das células B em que CD 19 está presente à superfície das células B.

5.6. PROTOCOLOS IMUNOTERAPÊUTICOS

As composições de anticorpos anti-CD19 usadas nos regimes/protocolos terapêuticos, aqui referidos como "imunoterapia anti-CD19" podem ser anticorpos nus, imunoconjugados e/ou proteínas de fusão. As composições da invenção podem ser usadas como um único agente terapêutico ou em combinação com outros agentes terapêuticos ou regimes. Os anticorpos anti-CD19 ou imunoconjugados podem ser administrados antes, ao mesmo tempo, ou a seguir à administração de um ou mais agentes terapêuticos. Agentes terapêuticos que podem ser usados em regimes terapêuticos de combinação com as composições da invenção incluem qualquer substância que inibe ou previne a função das células e/ou causa destruição das células. Exemplos, incluem, mas não são limitados a, isótopos radioativos,

agentes quimioterapêuticos, e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, de planta ou animal, ou fragmentos destas.

Os regimes terapêuticos aqui descritos, ou qualquer regime de tratamento desejado podem ser testados quanto à sua eficácia usando um modelo de animal transgênico tal como um modelo de ratinho descrito abaixo na Secção 6.2, que expressa antigénio CD 19 humano para além de ou em vez de antigénio CD19 nativo. Deste modo, um regime de tratamento com anticorpo anti-CD19 pode ser testado num modelo animal para determinar a eficácia antes da administração a um humano.

Os anticorpos anti-CD19 das composições e para uso nos métodos da invenção podem ser usados para tratar doenças das células B, incluindo malignidades das células B. O termo "malignidade das células B" inclui qualquer malignidade que deriva de uma célula da linhagem das células B. Malignidades das células B exemplificativas incluem, mas não são limitadas a: linfoma não de Hodgkin (NHL) subtipo de células B incluindo NHL de grau baixo/folicular, NHL linfocítico pequeno (SL), NHL de grau intermédio/folicular, NHL difuso de grau intermédio, NHL imunoblástico de alto grau, NHL linfoblástico de alto grau, NHL de células não clivadas pequenas de alto grau; linfoma das células do manto, e NHL de doença volumosa; Linfoma de Burkitt; mieloma múltiplo; leucemia linfoblástica aguda pré-B e outras malignidades que derivam dos precursores das células B iniciais; leucemia linfocítica aguda comum (ALL); leucemia linfocítica crónica (CLL) incluindo CLL mutada com imunoglobulina e CLL não mutada com imunoglobulina; leucemia de células pilosas; Leucemia linfoblástica aguda de tipo Null; Macroglobulinémia de Waldenstrom; linfoma difuso das células B grandes (DLBCL) incluindo DLBCL de

tipo células B de centro germinativo (GCB), DLBCL de tipo células B ativadas (ABC), e DLBCL de tipo 3; leucemia pró-linfocítica; doença da cadeia leve; plasmocitoma; mieloma osteoclerótico; leucemia de células plasmáticas; gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS); mieloma múltiplo latente (SMM); mieloma múltiplo indolente (IMM); linfoma de Hodgkin incluindo tipo pré-dominante de linfócito clássico e nodular; linfoma linfoplasmocítico (LPL); e linfoma da zona marginal incluindo linfoma do tecido linfoide associado a mucosa gástrica (MALT).

Os investigadores mostraram que os anticorpos e composições da invenção podem depletar células B maduras. Assim, como outro aspeto, a invenção pode ser empregue para tratar malignidades das células B maduras (isto é, que expressam Ig na superfície celular) incluindo mas não se limitando a linfoma folicular, linfoma das células do manto, linfoma de Burkitt, mieloma múltiplo, linfoma difuso das células B grandes (DLBCL) incluindo DLBCL de tipo células B de centro germinativo (GCB), DLBCL de tipo células B ativadas (ABC), e DLBCL de tipo 3; linfoma de Hodgkin incluindo tipo pré-dominante de linfócito clássico e nodular; linfoma linfoplasmocítico (LPL); linfoma da zona marginal incluindo linfoma do tecido linfoide associado a mucosa gástrica (MALT) e leucemia linfocítica crónica (CLL) incluindo CLL mutada com imunoglobulina e CLL não mutada com imunoglobulina.

Adicionalmente, CD 19 é expresso mais precocemente no desenvolvimento das células B do que, por exemplo, CD20, e é, portanto, particularmente adequado para o tratamento de pré-células B e de malignidades das células B maduras (isto é, que não expressam Ig na superfície celular), por exemplo, na medula óssea. Malignidades ilustrativas de pré-

células B e de células B imaturas incluem mas não são limitadas a leucemia linfoblástica aguda.

A invenção pode ser praticada para tratar tumores extranodais.

5.6.1. IMUNOTERAPIA ANTI-CD19

De acordo com a presente invenção a "imunoterapia anti-CD19" engloba a administração de quaisquer dos anticorpos anti-CD19 da invenção de acordo com qualquer um dos regimes terapêuticos aqui descritos. Os anticorpos anti-CD19 podem ser administrados como anticorpos nus, ou imunoconjugados ou proteínas de fusão.

A imunoterapia anti-CD19 engloba a administração do anticorpo anti-CD19 como um único agente terapêutico para o tratamento de uma malignidade das células B. A imunoterapia anti-CD19 engloba métodos para tratar de uma doença em fase precoce resultante de uma malignidade das células B. A imunoterapia anti-CD19 engloba métodos para tratar uma malignidade das células B em que o anticorpo anti-CD19 medeia ADCC. A imunoterapia anti-CD19 engloba métodos para tratar uma malignidade das células B em que o anticorpo anti-CD19 é administrado antes do paciente ter recebido qualquer tratamento para a malignidade, quer a terapia seja quimioterapia, à base de radio ou quimioterapia ou terapia cirúrgica.

Numa forma de realização preferida, um indivíduo humano com uma malignidade das células B pode ser tratado administrando um anticorpo humanizado que preferencialmente medeia ADCC em humanos. Em casos de estádios precoces da doença, ou terapias de agente único, qualquer anticorpo anti-CD19 que preferencialmente medeia ADCC pode ser usado

nos indivíduos humanos (incluindo anticorpos de murino e quiméricos); no entanto, anticorpos humanos e humanizados são preferidos.

Anticorpos do isotipo humano IgG1 ou IgG3s são preferidos para tratamento. No entanto, os isotipos humanos IgG2 ou IgG4 podem ser usados, desde que mediem ADCC em humanos. Essa função efetora pode ser avaliada medindo a capacidade do anticorpo em questão para mediar a lise da célula alvo por células efetoras *in vitro* ou *in vivo*.

A dose de anticorpo usada deve ser suficiente para depletar as células B em circulação. O progresso do tratamento pode ser monitorizado no paciente analisando amostras de sangue. Outros sinais de melhoria clínica podem ser usados para monitorizar o tratamento.

Métodos para medir a depleção das células B que podem ser usados em conexão com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não são limitados aos seguintes. A depleção das células B em circulação pode ser medida por citometria de fluxo usando um reagente que não um anticorpo anti-CD19 que se liga às células B para definir a quantidade de células B. Os níveis de anticorpo no sangue podem ser monitorizados usando análise sérica padrão. A depleção das células B pode ser medido indiretamente definindo a quantidade de um anticorpo conhecido a ser produzido pelas células B. O nível desse anticorpo é depois monitorizado para determinar a depleção e/ou depleção funcional das células B. A depleção das células B pode ser medido por coloração imunoquímica para identificar células B. As células B extraídas de tecidos do paciente podem ser colocadas em lâminas de microscópio, marcadas e examinadas quanto a presença ou ausência. A comparação é feita entre

células B extraídas antes do tratamento e depois para determinar diferenças na presença de células B.

A carga tumoral pode ser medida e usada em conexão com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção. Métodos para medir a carga tumoral são bem conhecidos na técnica e incluem, mas não se limitam aos seguintes. Análises PET podem ser usadas para medir a atividade metabólica e identificar áreas de maior atividade que são indicativas de tumores. Tomografias computadorizadas e MRI podem também ser usados para examinar os tecidos moles quanto à presença e tamanho dos tumores. Análises ósseas podem ser usadas para medir o volume tumoral e localização. A carga tumoral pode ser medida examinando o fluxo sanguíneo para dentro de para fora de um tumor usando tecnologia *doppler* (por exemplo, ecografia). Alterações do fluxo sanguíneo ao longo do tempo ou desvios em relação ao fluxo sanguíneo normal no tecido apropriado de um paciente podem ser usadas para calcular uma estimativa da carga tumoral. Esses métodos para medir a carga tumoral podem ser usados antes e a seguir aos métodos de tratamento da invenção.

Conforme aqui descrito, as células B são depletadas e/ou a carga tumoral diminui enquanto a função ADCC se mantém.

Quando o anticorpo anti-CD19 é administrado como agente de tratamento único, a invenção contempla o uso de diferentes regimes de tratamento.

De acordo com certos aspetos da invenção, o anticorpo anti-CD19 usado nas composições e para uso nos métodos da invenção, é um anticorpo nu. A dose de anticorpo anti-CD19 nu usada pode ser pelo menos cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5,

5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5 mg/kg de peso corporal de um paciente. A dose de anticorpo anti-CD19 nu usada pode ser pelo menos cerca de 1 até 10, 5 até 15, 10 até 20, ou 15 até 25 mg/kg de peso corporal de um paciente. A dose de anticorpo anti-CD19 nu usada pode ser pelo menos cerca de 1 até 20, 3 até 15, ou 5 até 10 mg/kg de peso corporal de um paciente. A dose de anticorpo anti-CD19 nu usada pode ser pelo menos cerca de 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 mg/kg de peso corporal de um paciente.

A dose pode compreender cerca de 375 mg/m² de anticorpo anti-CD19 administrado semanalmente durante 4 até 8 semanas consecutivas. A dose pode ser pelo menos cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ou 15 mg/kg do peso corporal do paciente administrada semanalmente durante 4 até 8 semanas consecutivas.

As doses exemplificativas de anticorpo anti-CD19 descritas acima podem ser administradas conforme descrito na Secção 5.4.3. As doses acima podem ser injeções de doses únicas. As doses podem ser administradas durante um período de tempo. As doses podem ser administradas múltiplas vezes durante um período de tempo. O período de tempo pode ser medido em dias, meses ou semanas. Doses múltiplas do anticorpo anti-CD19 podem ser administradas a intervalos adequados para conseguir o benefício terapêutico enquanto equilibra os efeitos secundários tóxicos. Por exemplo, quando são usadas doses múltiplas, é preferido temporizar os intervalos para permitir a recuperação da contagem de monócitos do paciente antes de repetir o tratamento com anticorpo. Este regime de dosagem vai otimizar a eficácia do tratamento, uma vez que a população de monócitos reflete a função ADCC do paciente.

As composições da invenção podem ser administradas a um paciente humano desde que o paciente seja responsivo ao tratamento. As composições da invenção podem ser administradas a um paciente humano desde que a doença do paciente não progrida. As composições da invenção podem ser administradas a um paciente humano até a doença do paciente não progredir ou tenha progredido durante um período de tempo, então o paciente não é administrado com as composições da invenção a menos que a doença ocorra novamente ou comece a progredir outra vez. Por exemplo, um paciente pode ser tratado com qualquer das doses acima durante cerca de 4 até 8 semanas, e durante esse tempo o paciente é monitorizado em relação à progressão da doença. Se a progressão da doença parar ou for revertida, então o paciente não vai ser administrado com as composições da invenção até que o paciente tenha uma recaída, isto é, a doença a ser tratada ocorra novamente ou progrida. Sobre esta nova ocorrência ou progressão, o paciente pode ser tratado novamente com o mesmo regime de dosagem inicialmente usado ou usando outras doses descritas acima.

As composições da invenção podem ser administradas como uma dose de ataque seguida de múltiplas doses mais pequenas (doses de manutenção) durante um período de tempo. As doses podem ser temporizadas e a quantidade ajustada para manter a eficácia da depleção das células B. A dose de ataque pode ser cerca de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, ou 18 mg/kg do peso corporal do paciente e a dose de manutenção é pelo menos cerca de 5 até 10 mg/kg do peso corporal do paciente. A dose de manutenção pode ser administrada a intervalos a cada 7, 10, 14 ou 21 dias. As doses de manutenção podem ser continuadas indefinidamente, até haver toxicidade, até a contagem de plaquetas diminuir, até não haver progressão da doença, até o paciente gerar uma resposta imune ao fármaco,

ou até a doença progredir para um estágio terminal. As composições da invenção podem ser administradas a um paciente humano até a doença progredir até um estágio terminal.

Quando os níveis de monócitos circulantes de um paciente são monitorizados como parte de um regime de tratamento, as doses de anticorpo anti-CD19 administradas podem ser espaçadas para permitir a recuperação da contagem de monócitos. Por exemplo, a composição pode ser administrada a intervalos a cada 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 dias.

Quando um anticorpo anti-CD19 é conjugado ou administrado em conjunto com uma toxina, um especialista na técnica vai apreciar que a dose de anticorpo anti-CD19 pode ser ajustada com base na dose de toxina e que a dose de toxina vai depender no tipo específico de toxina a ser usada. Tipicamente, quando uma toxina é usada, a dose de anticorpo anti-CD19 vai ser inferior à dose usada com um anticorpo anti-CD19 nu. A dose apropriada pode ser determinada para uma toxina particular usando técnicas bem conhecidas na técnica. Por exemplo, um estudo de variação da dose pode ser conduzido para determinar a dose máxima tolerada de anticorpo anti-CD19 quando administrada com ou conjugado a uma toxina.

Quando um anticorpo anti-CD19 é conjugado ou administrado em conjunto com um agente radioterapêutico, a dose do anticorpo anti-CD19 vai variar dependendo do agente radioterapêutico usado. Um processo de dois passos pode ser usado. Primeiro, o paciente humano é administrado com uma composição compreendendo um anticorpo anti-CD19 nu e cerca de 6, 7, 8, 9, ou 10 dias mais tarde uma pequena quantidade do agente radioterapêutico é administrada. Segundo, uma vez

que a tolerância, distribuição, e eliminação do tratamento de dose baixa tenham sido determinados, o paciente é administrado com uma dose do anticorpo anti-CD19 nu e em seguida uma quantidade terapêutica do agente radioterapêutico é administrada. Esses regimes de tratamento são semelhantes aos aprovados para tratamento de linfoma não de Hodgkin usando ZEVALIN™ (mAb anti-CD20 marcado com Índio) (Biogen Idec) ou BEXXAR™ (GSK, Coulter Pharmaceutical).

5.6.2. COMBINAÇÃO COM AGENTES QUIMIOTERAPÊUTICOS

A imunoterapia anti-CD19 (usando anticorpo nu, imunoconjugados, ou proteínas de fusão) pode ser usada em conjunto com outras terapias incluindo mas não se limitando a, quimioterapia, radioimunoterapia (RIT), quimioterapia e feixes de radiação externos (terapia de modalidade combinada, CMT), ou radioimunoterapia de modalidade combinada (CMRIT) sozinha ou em combinação, etc. O tratamento com anticorpo anti-CD19 da presente invenção pode ser administrado em conjunto com CHOP (Ciclofosfamida-Hidroxidoxorubicin-Oncovina (vincristina)-Prednisolona), o regime de quimioterapia mais comum para tratar linfoma não de Hodgkin. Como aqui usado, o termo "administrado em conjunto com" significa que a imunoterapia com anti-CD19 pode ser administrada antes, durante, ou subsequentemente a outros tratamentos empregues.

A imunoterapia com anti-CD19 pode ser em conjunto com um radioisótopo citotóxico ou isótopo radioterapêutico. Por exemplo, um isótopo emissor de alfa tal como ^{225}Ac , ^{224}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{224}Ra , ou ^{223}Ra . Alternativamente, o radioisótopo citotóxico pode ser um isótopo emissor de beta tal como ^{186}Re , ^{188}Re , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{177}Lu , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ou ^{64}Cu . Adicionalmente, o radioisótopo citotóxico pode emitir

Auger e eletrões de baixa energia e incluem os isótopos ^{125}I , ^{123}I ou ^{77}Br . O isótopo pode ser ^{198}Au , ^{32}P , e semelhantes. A quantidade de radioisótopo administrada ao indivíduo pode ser entre cerca de 0,001 mCi/kg e cerca de 10 mCi/kg.

A quantidade do radioisótopo administrada ao indivíduo pode ser entre cerca de 0,1 mCi/kg e cerca de 1,0 mCi/kg. A quantidade do radioisótopo administrada ao indivíduo pode ser entre cerca de 0,005 mCi/kg e 0,1 mCi/kg.

A imunoterapia anti-CD19 pode ser em conjunto com uma toxina química ou agente quimioterapêutico. Preferencialmente a toxina química ou agente quimioterapêutico é selecionada a partir do grupo consistindo em enediína tal como caliqueamicina e esperamicina; duocarmicina, metotrexato, doxorubicina, melfalano, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platina, etopósido; bleomicina e 5-fluorouracilo.

Toxinas químicas adequadas ou agentes quimioterapêuticos que podem ser usados em terapias de combinação com a imunoterapia anti-CD19 incluem membros da família das moléculas de enediínas, tal como caliqueamicina e esperamicina. Toxinas químicas podem também ser tomadas do grupo consistindo em duocarmicina (ver, por exemplo, Pat. U.S. No. 5,703,080 e Pat. U.S. No. 4,923,990), metotrexato, doxorubicina, melfalano, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platina, etopósido, bleomicina e 5-fluorouracilo. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem também Adriamicina, Doxorubicina, 5-Fluorouracilo, Citosina-arabinósido ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotere (docetaxel), Busulfan, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalano, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C,

Mitoxantrona, Vincreistina, Vinorelbina, Carboplatina, Tenipósido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitorinincinas, Esperamicinas (ver, Pat. U.S. No. 4,675,187), Melfalano e outras mostardas de azoto relacionadas.

"CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200-400 mg/m² de etopósido, e 150-200 mg/m² de carmustina) pode ser usado nas terapias de combinação da invenção. CVB é um regime usado para tratar linfoma não de Hodgkin. Patti et al., Eur. J. Haematol. 51:18 (1993). Outras combinações adequadas de regimes quimioterapêuticos são bem conhecidas dos especialistas na técnica. Ver, por exemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas," in CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3ª Edição, Holland et al. (eds.), pp. 2028-2068 (Lea & Febiger 1993). Como uma ilustração, regimes quimioterapêuticos de primeira geração para tratamento de linfoma não de Hodgkin de grau intermédio incluem C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona) e CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, e prednisona). Um regime quimioterapêutico útil de segunda geração é m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona e leucovorina), enquanto que um regime de terceira geração adequado é MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina e leucovorina). Fármacos úteis adicionais incluem fenil butirato e brostatina-1. Num tratamento multimodal preferido, ambos os fármacos quimioterapêuticos e citoquinas são coadministrados com um anticorpo, imunoconjugado ou proteína de fusão de acordo com a presente invenção. As citoquinas, fármacos quimioterapêuticos e anticorpo, imunoconjugados ou proteína de fusão podem ser administrados por qualquer ordem, ou conjuntamente.

Outras toxinas que são preferidas para uso nas composições e com anticorpos para uso nos métodos da invenção incluem lectinas venenosas, lectinas vegetais tais como as toxinas ricina, abrina, modicina, botulina e da difteria. Claro que combinações das várias toxinas podem ser acopladas a uma molécula de anticorpo acomodando assim citotoxicidade variável. Exemplos de toxinas que são adequadamente empregues em terapias de combinação da invenção são ricina, abrina, ribonuclease, DNase I, Enterotoxina-A estafilocócica, proteína antiviral de *Phytolacca americana*, gelonina, toxina difterina, exotoxina de *Pseudomonas*, e endotoxina de *Pseudomonas*. Ver, por exemplo, Pastan et al., Cell 47:641 (1986), e Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians 44:43 (1994). Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas que podem ser usados incluem cadeia A da difteria, fragmentos ativos não ligantes da toxina da difteria, cadeia A da exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, Alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inibidor de *Saponaaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos. Ver, por exemplo, WO 93/21232 publicada em Outubro 28, 1993.

Toxinas e agentes quimioterapêuticos adequados são descritos em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), e em GOODMAN E GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985). Outras toxinas e/ou agentes quimioterapêuticos adequados são conhecidos dos especialistas na técnica.

A imunoterapia anti-CD19 da presente invenção pode também ser em conjunto com uma enzima ativadora de pró-fármaco que converte um pró-fármaco (por exemplo, um agente peptídico quimioterapêutico, ver, WO81/01145) num fármaco anticancerígeno ativo. Ver, por exemplo, WO 88/07378 e Patente U.S. No. 4,975,278. O componente de enzima dessas combinações inclui qualquer enzima capaz de ativar um pró-fármaco de tal modo que o converte na sua forma mais ativa, a forma citotóxica. O termo "pró-fármaco" como usado neste pedido refere-se a um precursor ou forma derivada de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica para as células tumorais comparado com o fármaco parente e é capaz de ser enzimaticamente ativado ou convertido na forma parente mais ativa. Ver, por exemplo, Wilman, "Pro-drugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) e Stella et al., "Pro-drugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Pró-fármacos que podem ser usados em combinação com os anticorpos anti-CD19 da invenção incluem, mas não são limitados a, pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo péptidos, pró-fármacos modificados com D-aminoácidos, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos contendo α -lactama, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituídos ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituídos, 5-fluorocitosina e outros pró-fármacos de 5-fluorouridina que podem ser convertidos no fármaco livre citotóxico mais ativo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivatizados numa forma de pró-fármaco para uso nesta invenção incluem, mas não são limitados a, aqueles agentes quimioterapêuticos descritos acima.

A administração das composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção pode permitir o adiamento da terapia tóxica e pode ajudar a evitar efeitos secundários desnecessários e os riscos das complicações associadas à quimioterapia e retardar o desenvolvimento de resistência à quimioterapia. Terapias tóxicas e/ou resistência a terapias tóxicas podem ser retardadas em pacientes administrados com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção até cerca de 6 meses, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 anos.

5.6.3. COMBINAÇÃO COM ANTICORPOS TERAPÊUTICOS

A imunoterapia anti-CD19 aqui descrita pode ser administrada em combinação com outros anticorpos, incluindo, mas não se limitando a, mAb anti-CD20, mAb anti-CD52, anticorpo anti-CD22 (como descrito, por exemplo, na Patente U.S. No. 5,484,892, publicação da patente U.S. número 2004/0001828 do pedido U.S. de número de série 10/371,797, publicação da patente U.S. número 2003/0202975 do pedido U.S. de número de série 10/372,481 e pedido provisório U.S. de número de série 60/420,472), e anticorpos anti-CD20, tais como RITUXAN™ (C2B8; RITUXIMAB™; Biogen Idec). Outros exemplos de anticorpos terapêuticos que podem ser usados em combinação com os anticorpos da invenção ou usados nas composições da invenção incluem, mas não são limitados a, HERCEPTIN™ (Trastuzumab; Genentech), MYLOTARG™ (Gemtuzumabe ozogamicina; Wyeth Pharmaceuticals), CAMPATH™ (Alemtuzumabe; Berlex), ZEVALIN™ (Ipritumomabe tiuxetano; Biogen Idec), BEXXAR™ (Tositumomabe; GlaxoSmithKline Corixa), ERBITUX™ (Cetuximabe; Imclone), e AVASTIN™ (Bevacizumabe; Genentech).

O mAb anti-CD19 e anti-CD20 e/ou anti-CD22 pode ser

administrado opcionalmente na mesma composição farmacêutica, em qualquer proporção adequada. Para ilustrar, a proporção do anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 pode ser uma proporção de cerca de 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 ou 1:1000 ou mais. Do mesmo modo, a proporção do anticorpo anti-CD19 e anti-CD22 pode ser uma proporção de cerca de 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 90:1, 80:1, 70:1, 60:1, 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:250, 1:500 ou 1:1000 ou mais.

5.6.4. COMPOSTOS DE COMBINAÇÃO QUE MELHORAM A FUNÇÃO DOS MONÓCITOS OU MACRÓFAGOS

Em certas formas de realização dos métodos da invenção, um composto que melhora a função dos monócitos ou macrófagos (por exemplo, pelo menos cerca de 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95% ou mais) pode ser usado em conjunto com a imunoterapia com anti-CD19. Esses compostos são conhecidos na técnica e incluem, sem limitação, citocinas tais como interleucinas (por exemplo, IL-12), e interferões (por exemplo, alfa ou gama interferão).

O composto que melhora a função dos monócitos ou macrófagos ou melhorador pode ser formulado na mesma composição farmacêutica que o anticorpo, imunoconjugado ou fragmento de ligação ao antígeno. Quando administrado separadamente,

o anticorpo/fragmento e o composto podem ser administrados concorrentemente (dentro de um período de horas entre cada um), podem ser administrados durante o mesmo curso de tratamento, ou podem ser administrados sequencialmente (isto é, o paciente recebe primeiro um curso de tratamento do anticorpo/fragmento e depois um curso do composto que melhora a função dos macrófagos/monócitos ou vice versa). O composto que melhora a função dos monócitos ou macrófagos é administrado a um indivíduo humano antes, ao mesmo tempo, ou depois do tratamento com outros regimes terapêuticos e/ou as composições da invenção. O indivíduo humano pode ter uma contagem sanguínea de leucócitos, monócitos, neutrófilos, linfócitos, e/ou basófilos que está dentro da gama normal para humanos. A gama normal para leucócitos sanguíneos humanos (total) é cerca de 3,5- cerca de 10,5 ($10^9/L$). A gama normal para neutrófilos sanguíneos humanos é cerca de 1,7- cerca de 7,0 ($10^9/L$), monócitos é cerca de 0,3- cerca de 0,9 ($10^9/L$), linfócitos é cerca de 0,9- cerca de 2,9 ($10^9/L$), basófilos é cerca de 0- cerca de 0,3 ($10^9/L$), e eosinófilos é cerca de 0,05- cerca de 0,5 ($10^9/L$). O indivíduo humano pode ter uma contagem de leucócitos sanguíneos que é inferior à gama normal para humanos, por exemplo inferior a cerca de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, ou 0,8 ($10^9/L$) leucócitos.

Esta forma de realização da invenção pode ser praticada com os anticorpos, imunoconjugados ou fragmentos de anticorpo da invenção ou com outros anticorpos conhecidos na técnica e é particularmente adequada para indivíduos que são resistentes à terapia com anticorpo anti-CD19, anti-CD20 e/ou anti-CD22 (por exemplo, terapia com anticorpos existentes tais como C2B8), indivíduos que estão atualmente a ser ou foram previamente tratados com quimioterapia, indivíduos que tiveram uma recaída num distúrbio das células B, indivíduos que são imunocomprometidos, ou

indivíduos que de outro modo têm um defeito na função dos macrófagos ou monócitos. A prevalência de pacientes que são resistentes à terapia ou têm uma recaída num distúrbio das células B pode ser atribuída, pelo menos em parte, a um defeito na função dos macrófagos ou monócitos. Assim, a invenção fornece métodos para melhorar a função ADCC e/ou dos macrófagos e/ou dos monócitos a serem usados em conjunto com os métodos de administrar anticorpos anti-CD19.

5.6.5. COMBINAÇÃO COM AGENTES IMUNOREGULADORES

A imunoterapia anti-CD19 da presente invenção pode também ser usada em conjunto com um agente imunoregulador. Nesta abordagem, o uso de anticorpos quiméricos é preferida; o uso do anticorpo anti-CD19 humanizado é a mais preferida. O termo "agente imunoregulador" como aqui usado para terapia de combinação refere-se a substâncias que atuam para suprimir, mascarar, ou melhorar o sistema imune do hospedeiro. Isto pode incluir substâncias que suprimem a produção de citocinas, regulam negativamente ou suprimem a expressão do auto-antigénio, ou mascaram os antígenos MHC. Exemplos desses agentes incluem pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-substituídas (ver, Pat. U.S. No. 4,665,077), azatioprina (ou ciclofosfamida, se houver uma reação adversa a azatioprina); bromocriptina; glutaraldeído (que mascara os antígenos MHC, conforme descrito na Pat. U.S. No. 4,120,649); anticorpos anti-idiotípicos para antígenos MHC e fragmentos de MHC; ciclosporina A; esteroides tais como glucocorticosteroides, por exemplo, prednisona, metilprednisolona, e dexametasona; citocina ou antagonistas dos receptores de citocina incluindo anticorpos anti-interferon- γ , $-\beta$, ou $-\alpha$; anticorpos anti-fator de necrose tumoral $-\alpha$; anticorpos anti-fator de necrose tumoral β ; anticorpos anti-interleucina-2 e

anticorpos anti-recetores de IL-2; anticorpos anti-L3T4; globulina heteróloga anti-linfócito; anticorpos panT, preferencialmente anticorpos anti-CD3 ou anti-CD4/CD4a; péptido solúvel contendo um domínio de ligação LFA-3 (WO 90/08187 publicada Jul. 26, 1990); estreptoquinase; TGF- β ; estreptodornase; ARN ou ADN do hospedeiro; FK506; RS-61443; desoxispergualina; rapamicina; recetor de células T (Pat. U.S. No. 5,114,721); fragmentos de recetor das células T (Offner et al., Science 251:430-432 (1991); WO 90/11294; e WO 91/01133); e anticorpos dos recetores das células T (EP 340,109) tais como T10B9. Exemplos de citocinas incluem, mas não são limitados a linfoquinas, monoquinas, e hormonas polipeptídicas tradicionais. Incluídas entre as citocinas estão a hormona de crescimento tal como a hormona de crescimento humana, hormona de crescimento N-metionil humana, e hormona de crescimento bovina; hormona paratiroideia; tiroxina; insulina; pró-insulina; relaxina; pró-relaxina; hormonas glicoproteicas tais como hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimuladora da tiroide (TSH), e hormona luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento dos fibroblastos; prolactina; lactogénio placentário; fator de necrose tumoral α ; substância inibidora mulleriana; péptido associado à gonadotropina de ratinho; inibina; ativina; fator de crescimento endotelial vascular integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento dos nervos tais como NGF- α ; fator de crescimento plaquetário; fatores de crescimento transformadores (TGFs) tais como TGF- α e TGF- α ; fator de crescimento tipo insulina -I e -II; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutivos; interferões; fatores estimulantes de colónias (CSFs) tais como macrófago-CSF (M-CSF); granulócito-macrófago-CgP (GM-CSF); e granulócito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; IL-15; um fator de necrose tumoral tal

como TNF- α ou TNF- β ; e outros fatores polipeptídicos incluindo LIF e *kit* ligando (KL). Como aqui usado, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de culturas de células recombinantes e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa. Conforme aqui descrito, os métodos incluem ainda administrar ao indivíduo um ou mais agentes imunomoduladores, preferencialmente uma citocina. Citocinas preferidas são selecionadas a partir do grupo consistindo em interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-12, IL-15, IL-18, G-CSF, GM-CSF, trombopoietina, e interferon γ .

Estes agentes imunorreguladores podem ser administrados ao mesmo tempo ou em tempos separados dos anticorpos anti-CD19 da invenção, e são usados nas mesmas ou em doses inferiores ao indicado na técnica. O agente imunoregulador preferido vai depender de muitos fatores, incluindo o tipo de distúrbio a ser tratado, assim como a história do paciente, mas uma preferência geral é que o agente seja selecionado de entre ciclosporina A, um glucocorticosteroide (o mais preferencialmente prednisona ou metilprednisolona), anticorpo monoclonal OKT-3, azatioprina, bromocriptina, globulina heteróloga anti-linfócitos, ou uma mistura destes.

5.6.6. COMBINAÇÃO COM OUTROS AGENTES TERAPÊUTICOS

Agentes que atuam na neovasculatura do tumor podem também ser usados em conjunto com imunoterapia anti-CD19 e incluem agentes de ligação à tubulina tal como combrestatina A4 (Griggs et al., Lancet Oncol. 2:82, (2001)) e angiostatina e endostatina (revisto em Rosen, Oncologist 5:20, 2000, incorporado aqui como referência). Imunomoduladores adequados para uso em combinação com anticorpos anti-CD19

incluem, mas não são limitados a, interferão α , interferão γ , e fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Os agentes terapêuticos usados em terapias de combinação usando as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção são péptidos.

A imunoterapia anti-CD19 pode ser em conjunto com uma ou mais moléculas de caliqueamicina. A família das caliqueamicinas de antibióticos são capazes de produzir quebras de ADN de cadeia dupla em concentrações sub-picomolares. Análogos estruturais da caliqueamicina que podem ser usados incluem, mas não são limitados a, γ 11, γ 21, γ 31, N-acetil- γ 11, PSAG e 011 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993) e Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

Alternativamente, a proteína de fusão compreendendo um anticorpo anti-CD19 da invenção e um agente citotóxico pode ser feita, por exemplo, por técnicas recombinantes ou síntese peptídica.

Um anticorpo anti-CD19 da invenção pode ser conjugado a um "recetor" (tal como estreptavidina) para utilização no pré-direcionamento ao tumor em que o conjugado antagonista-recetor é administrado ao paciente, seguido de remoção do conjugado não ligado da circulação usando um agente de limpeza e depois administração de um "ligando" (por exemplo, biotina) que é conjugada a um agente terapêutico (por exemplo, um radioisótopo).

Um regime de tratamento pode incluir compostos que mitigam os efeitos citotóxicos das composições de anticorpo anti-CD19 da invenção. Esses compostos incluem analgésicos (por exemplo, acetaminofeno), bisfosfonatos, antihistaminas (por exemplo, maleato de clorfeniramina), e esteroides (por

exemplo, dexametasona, retinoides, deltoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, desidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrogênio, testosterona, progestinas).

O agente terapêutico usado em combinação com a imunoterapia anti-CD19 da invenção pode ser uma pequena molécula (isto é, compostos inorgânicos ou orgânicos com um peso molecular inferior a cerca de 2500 Dalton). Por exemplo, bibliotecas de pequenas moléculas podem ser obtidas comercialmente de Specs e BioSpecs B.V. (Rijswijk, Holanda), Chembridge Corporation (San Diego, CA), Comgenex USA Inc. (Princeton, NJ), e Maybridge Chemicals Ltd. (Cornwall PL34 OHW, Reino Unido).

A imunoterapia anti-CD19 pode ser administrada em combinação com um agente antibacteriano. Exemplos não limitativos de agentes antibacterianos incluem proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusão, anticorpos, moléculas de ácido nucleico, moléculas orgânicas, moléculas inorgânicas, e pequenas moléculas que inibem e/ou reduzem uma infecção bacteriana, inibem e/ou reduzem a replicação de bactérias, ou inibem e/ou reduzem a propagação de bactérias a outras células ou indivíduos. Exemplos específicos de agentes antibacterianos incluem, mas não são limitados a, antibióticos tais como penicilina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, estreptomicina, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomicina, trimetoprima, norfloxacin, rifampina, polimixina, anfotericina B, nistatina, ketocanazole, isoniazida, metronidazole, e pentamidina.

A imunoterapia com anti-CD19 da invenção pode ser

administrada em combinação com um agente antifúngico. Exemplos específicos de agentes antifúngicos incluem, mas não são limitados a, fármacos azoles (por exemplo, miconazole, ketoconazole (NIZORAL®), acetato de caspofungina (CANCIDAS®), imidazole, triazoles (por exemplo, fluconazole (DIFLUCAN®), e itraconazole (SPORANOX®)), polieno (por exemplo, nistatina, anfotericina B (FUNGIZONE®), complexo de lípido B da anfotericina ("ABLC") (ABELCET®), dispersão coloidal de anfotericina B ("ABCD") (AMPHOTEC®), anfotericina B lipossomal (AMBISONE®)), iodeto de potássio (KI), pirimidina (por exemplo, flucitosina (ANCOBON®)), e voriconazole (VFEND®). A administração de agentes antibacterianos e antifúngicos pode mitigar os efeitos ou a escalada de doenças infecciosas que podem ocorrer nos métodos da invenção em que as células B de um paciente são significativamente depletadas.

A imunoterapia anti-CD19 da invenção pode ser administrada em combinação com um ou mais dos agentes descritos acima para mitigar os efeitos secundários tóxicos que podem acompanhar a administração das composições da invenção. A imunoterapia anti-CD19 da invenção pode ser administrada em combinação com um ou mais agentes que são bem conhecidos na técnica para uso para mitigar os efeitos secundários da administração de anticorpos, quimioterapia, toxinas, ou fármacos.

Conforme aqui descrito, quando a imunoterapia anti-CD19 da invenção é administrada para tratar mieloma múltiplo, as composições da invenção podem ser administradas em combinação ou em regimes de tratamento com quimioterapia de dose elevada (melfalano, melfalano/prednisona (MP), vincristina/doxorubicina/dexametasona (VAD), doxorubicina lipossomal /vincristina, dexametasona (DVd), ciclofosfamida, etopósido/dexametasona/citarabina,

cisplatina (EDAP)), transplantes de células estaminais (por exemplo, transplante de células estaminais autólogo ou transplante de células estaminais alogeneico, e/ou transplante de células estaminais mini-alogeneico (não-mieloablativa)), radioterapia, esteroides (por exemplo, corticosteroides, dexametasona, talidomida/dexametasona, prednisona, melfalano/prednisona), terapia de suporte (por exemplo, bisfosfonatos, fatores de crescimento, antibióticos, imunoglobulina intravenosa, radioterapia de dose baixa, e/ou intervenções ortopédicas), THALOMID™ (talidomida, Celgene), e/ou VELCADE™ (bortezomibe, Millennium).

Conforme aqui descrito quando a imunoterapia anti-CD19 da invenção é administrada em combinação com outro anticorpo ou anticorpos e/ou agente, o anticorpo adicional ou anticorpos e/ou agentes podem ser administrados em qualquer sequência em relação à administração do anticorpo desta invenção. Por exemplo, o anticorpo ou anticorpos adicionais podem ser administrados antes, ao mesmo tempo, e/ou subsequentemente à administração do anticorpo anti-CD19 ou imunoconjugado da invenção a um indivíduo humano. O anticorpo adicional ou anticorpos podem estar presentes na mesma composição farmacêutica que o anticorpo da invenção, e/ou presentes numa composição diferente farmacêutica. A dose e modo de administração do anticorpo desta invenção e a dose do anticorpo ou anticorpos adicionais pode ser a mesma ou diferente, de acordo com qualquer dos ensinamentos de quantidades de dosagem e modos de administração como fornecido neste pedido e como são bem conhecidas na técnica.

5.7. USO DE ANTICORPOS ANTI-CD19 NO DIAGNÓSTICO DE MALIGNIDADES DAS CÉLULAS B

A presente invenção também engloba anticorpos anti-CD19, e composições dos mesmos, que se ligam imunoespecificamente ao antígeno CD 19 humano, e esses anticorpos anti-CD19 são conjugados a um agente de diagnóstico ou detetável. Em formas de realização preferidas, os anticorpos são anticorpos anti-CD19 humanizados. Esses anticorpos anti-CD19 podem ser úteis para monitorizar ou fazer um prognóstico do desenvolvimento ou progressão de uma malignidade das células B como parte de um procedimento de teste clínico, tal como determinar a eficácia de um tratamento específico. Esse diagnóstico e detecção podem ser conseguidos acoplando um anticorpo anti-CD19 que se liga imunoespecificamente ao antígeno CD 19 humano a uma substância detetável incluindo, mas não se limitando a, várias enzimas, tais como mas não se limitando a, peroxidase de rábano, fosfatase alcalina, beta-galactosidase, ou acetilcolinesterase; grupos prostéticos, tais como mas não se limitando a, estreptavidina/biotina e avidina/biotina; materiais fluorescentes, tais como mas não se limitando a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocinato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloreto de dansilo ou ficoeritrina; materiais luminescentes, tais como mas não se limitando a, luminol; materiais bioluminescentes, tais como mas não se limitando a, luciferase, luciferina, e aequorina; materiais radioativos, tais como mas não se limitando a iodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S) trítio (^3H), índio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In) e tecnécio (^{99}Tc), tálio (^{201}Tl), gálio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paládio (^{103}Pd), molibdénio (^{99}Mo), xénon (^{133}Xe), fluor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn ,

e ^{117}Tin ; metais emissores de positrões usando várias tomografias de emissão de positrões, iões metálicos paramagnéticos não radioativos, e moléculas que são radiomarcadas ou conjugadas a radioisótopos específicos. Qualquer marcador detetável que pode ser facilmente medido pode ser conjugado a um anticorpo anti-CD19 e usado no diagnóstico de malignidades das células B. A substância detetável pode ser acoplada ou conjugada diretamente a um anticorpo ou indiretamente, através de um intermediário (tal como, por exemplo, um ligante conhecido na técnica) usando técnicas conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 4,741,900 para iões metálicos que podem ser conjugados com anticorpos para uso como diagnóstico de acordo com a presente invenção. Conforme aqui descrito, a presente divulgação fornece *kits* diagnósticos compreendendo um anticorpo anti-CD19 conjugado a um agente de diagnóstico ou detetável.

5.8. *KITS*

A presente divulgação fornece um pacote ou *kit* farmacêutico compreendendo um ou mais recipientes cheios com uma composição da presente divulgação para a prevenção, tratamento, gestão ou melhoria de uma malignidade das células B, ou um ou mais dos seus sintomas, potenciado por ou que potencia uma malignidade das células B.

A presente divulgação fornece *kits* que podem ser usados nos métodos descritos acima. Um *kit* compreende uma composição da presente divulgação, num ou mais recipientes. Numa outra modalidade de realização, um *kit* compreende a composição da invenção, num ou mais recipientes, e um ou mais profiláticos ou agentes terapêuticos diferentes úteis para a prevenção, gestão ou tratamento de uma malignidade das

células B, ou um ou mais dos seus sintomas, potenciado por ou que potencia uma malignidade das células B num ou mais recipientes diferentes. O *kit* compreende ainda instruções para prevenir, tratar, gerir ou melhorar uma malignidade das células B, assim como informação sobre os efeitos secundários e dosagem para o método de administração. Opcionalmente, associado a esse recipiente(s) pode estar informação na forma prescrita por uma agência governamental regulando o fabrico, uso ou venda de produtos farmacêuticos ou biológicos, informação essa que reflete a licença pela agência de fabrico, uso ou venda para administração humana.

6. EXEMPLOS

Nos exemplos a seguir, um modelo de ratinho transgénico foi usado para avaliar imunoterapias dirigidas a CD19 humano. Estes dados mostram que os anticorpos que se ligam ao antígeno CD19 e mediam ADCC são eficazes a induzir a depleção das células B *in vivo*, em indivíduos com células efectoras que expressam FcγR, (preferencialmente, FcγRIII ou FcγRIV) e realizam ADCC. Esses anticorpos podem ser usados para induzir depleção durável das células B *in vivo*, e em certas formas de realização podem eliminar virtualmente todas as células B da circulação, baço e nódulos linfáticos. Surpreendentemente, células B da medula óssea e seus precursores que expressam densidades relativamente baixas do antígeno CD19 são também depletadas. A eficácia da depleção das células B não está dependente de qual é a região do CD19 humano a que um anticorpo anti-CD19 se liga, mas é influenciada pela densidade de CD19 (na amostra do paciente). A eficácia de eliminação das células B pode correlacionar-se com a capacidade do anticorpo anti-CD19 de mediar ADCC. A eficácia da eliminação das células B usando anticorpos anti-CD19 pode também correlacionar-se com a expressão/função de FcγR efector hospedeiro.

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Os anticorpos anti-CD19 HB12a e HB12b de murino aqui descritos são exemplificativos de anticorpos que se ligam a CD 19 humano. Esses anticorpos podem ser usados para modificar anticorpos anti-CD19 humanos, humanizados, ou quimérico usando as técnicas descritas acima na Secção 5.1. Anticorpos anti-CD19 humanos, humanizados, ou quiméricos têm a mesma especificidade para CD19 humano ou porções deste assim como os anticorpos HB12a e HB12b são contemplados para uso nas composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção. Em particular, anticorpos anti-CD19 humanos, humanizados, ou quiméricos com as mesmas ou semelhantes regiões da cadeia pesada CDR1, CDR2, e/ou CDR3 que HB12a ou HB12b são contemplados para uso nas composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção.

6.1.1. Materiais e Métodos

Produção de Anticorpos e Análise de Sequências. Os anticorpos HB12a e HB12b foram gerados em ratinhos Balb/c imunizados com uma linha de pré-células B de ratinho que foram transfetados com cADNs codificando CD19 humano (Zhou et al., Mol. Célula Biol., 14:3884-94 (1994)). Ambos os anticorpos foram submetidos ao Fifth International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens que teve lugar em Boston a 3-7 de novembro, 1993.

A utilização dos genes da cadeia pesada foi determinada usando ARN extraído com $1-5 \times 10^6$ células de hibridoma usando o Mini Kit RNEASY® (QIAGEN®, Valencia, CA). A primeira cadeia de cADN foi sintetizada num volume de 20 µL a partir de 2 µg de ARN total usando 200 unidades de

transcriptase reversa SUPERScript III® e a primeira cadeia de cADN, tampão de síntese da INVITROGEN® (Carlsbad, CA), 20 ng de primers hexâmeros aleatórios e 20 unidades de inibidor de RNase da PROMEGA® (Madison, WI), e 80 nmoles de dNTP da Denville (Metuchen, NJ). Um μ L da solução de cADN foi usado como padrão para amplificação de PCR dos genes da cadeia pesada (V_H). Reações de PCR foram realizadas num volume de 50- μ L de uma mistura de reação composta por 10 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 5 mM de NH_4Cl , 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 800 μ M de dNTP (Denville), 400 pmol de cada primer, e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) com 10% pfu de polimerase "proofreading" (Stratagene, LaJolla, CA). Para V_L , as reações de PCR foram realizadas num volume de 50- μ L de uma mistura de reação composta por 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 800 μ M de dNTP (Denville), 400 pmol de cada primer, e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) enriquecida com 10% pfu de polimerase "proofreading" (Stratagene). Depois de um passo de desnaturação durante 3 min, a amplificação foi durante 32 ciclos (94°C durante 1 min, 58°C durante 1 min, 72°C durante 1 min) seguido de uma extensão de 10 minutos a 72°C (Thermocycler, Perkin Elmer). O cADN de cadeia pesada foi amplificado usando um primer promíscuo de sentido 5' V_H (MsVHE; 5' GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G 3') (SEQ ID NO:19) como previamente descrito (Kantor et al., J. Immunol., 158: 1175-1186 (1997)) e um primer antissentido complementar à região C γ codificante (primer C γ 1; 5' GAG TTC CAG GTC ACT GTC ACT GGC TCA GGG A3') (SEQ ID NO:20).

A utilização do gene de cadeia leve foi determinada usando ARN citoplasmático extraído como descrito para a cadeia pesada. A sequência de nucleótidos 5' da região variável foi obtida a partir de cADN que foi gerado usando o *kit* GeneRacer™ (Invitrogen). O ARN total foi desfosforilado com fosfatase intestinal de vitelo. A estrutura cap 5' foi

removida do mARN intacto, de comprimento total com ácido pirofosfatase de tabaco. Um oligo RNA GeneRacer foi ligado à extremidade 5' do mARN usando RNA ligase T4 fornecendo um sítio de primer conhecido 5' para primers de PCR GeneRacer depois de o mARN ter sido transcrito em cADN. O mARN ligado foi transcrito reversamente com Superscript™III RT e o primer GeneRacer aleatório. A primeira cadeia de cADN foi amplificada usando o primer 5' GeneRacer (homólogo ao RNA oligo GeneRacer) e um primer antissentido 3' da região constante específica (GAC TGA GGC ACC TCC AGA TGT TAA CTG) (SEQ ID NO:21). Amplificações de PCR Touchdown foram realizadas num volume de 50-µL com tampões como recomendado por Invitrogen, usando 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) com 10% pfu de polimerase "proofreading" (Stratagene) adicionados. Depois de um passo de desnaturação de 2 min, Taq e pfu foram adicionados e a amplificação foi realizada em 3 passos: cinco ciclos de 94°C durante 30 s, 72°C durante 60 s; 5 ciclos de 94°C durante 30 s, 72°C durante 60 s; 20 ciclos de 94°C durante 30 s, 65°C durante 30 s, 72°C durante 60 s, seguido por extensão de 10 min a 72°C. 2,5 U de Taq foram adicionadas e a extensão deixada prosseguir durante outros 10 min para assegurar saliências 3' A intactos. Os produtos de PCR amplificados foram clonados no vetor pCR4-TOPO para sequenciação e transformados em células competentes OneShot® TOP10. Inserções de ADN de 8 clones foram sequenciadas para cada cadeia leve de mAb usando os primers de vetor específico pCR4-TOPO "M 13 Forward" e "M 13 Reverse", como descrito para a cadeia pesada.

Os produtos de PCR da cadeia pesada e leve purificados foram sequenciados diretamente em ambas as direções usando um sequenciador de ADN ABI 377 PRISM® após amplificação usando o sistema de Sequenciação Terminador de Corante Perkin Elmer com DNA polimerase AmpliTaq® e os mesmos

primers usados para amplificação por PCR inicial ou primers específicos de vetor pCR4-TOPO, como descrito para a cadeia leve. As regiões da cadeia pesada e leve de HB 12a e HB 12b foram sequenciadas completamente em ambos os filamentos de ADN de sentido e antissentido.

Anticorpos e Análise de Imunofluorescência. Anticorpos anti-CD19 monoclonais de ratinho que se ligam ao antigénio CD 19 humano aqui usados incluíam HB12a (IgG1) e HB12b (IgG1), FMC63 (IgG2a, Chemicon International, Temecula, CA), B4 (IgG1, Beckman Coulter, Miami, FL) (Nadler et al., J. Immunol., 131:244-250 (1983)), e HD237 (IgG2b, Fourth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens, Viena, Áustria, 1989), uma variante de troca de isotipo do anticorpo HD37 (Pezzutto et al., J. Immunol., 138:2793-2799 (1987)). Outros anticorpos incluem: anticorpo anti-CD19 monoclonal de ratinho o qual se liga ao CD 19 de ratinho, MB 19-1 (IgA) (Sato et al., J. Immunol., 157:4371-4378 (1996)); anticorpos monoclonais específicos para CD20 de ratinho (Uchida et al., Intl. Immunol., 16:119-129 (2004)); anticorpo RA3-6B2 B220 (DNAX Corp., Palo Alto, CA); anticorpo Thy1.2 (CALTAG™ Laboratories, Burlingame, CA); e anticorpos CD5, CD43 e CD25 (BD PHARMINGEN™, Franklin Lakes, NJ). Os anticorpos Ig ou IgM anti-ratinho de isotipo específicos eram da Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL).

A linha de células pré-B de ratinho, 300.19 (Alt et al., Cell, 27:381-388 (1981)), transfetada com cADN de hCD19 (Tedder e Isaacs, J. Immunol., 143:712-717 (1989)), ou suspensões de células individuais de leucócitos foram coradas sobre gelo usando concentrações ótimas pré-determinadas de cada anticorpo durante 20-30 minutos de acordo com métodos estabelecidos (Zhou et al., Mol Cell Biol., 14:3884-3894 (1994)). As células com as propriedades

de dispersão da luz para a frente e para o lado dos linfócitos foram analisadas em citômetros de fluxo FACSCAN® ou FACSCALIBUR® (Becton Dickinson, San Jose, CA). A coloração de fundo foi determinada usando anticorpos de controlo não reativos (CALTAG™ Laboratories, Burlingame, CA) com limites posicionados para excluir $\geq 98\%$ das células. Para cada amostra examinada, dez mil células com as propriedades de dispersão para a frente e laterais das células mononucleares foram analisadas para cada amostra quando possível, com intensidades de fluorescência mostrada numa escala log de quatro décadas.

Ratinhos. Ratinhos transgênicos expressando CD19 humano (h19-1) e animais da mesma ninhada do tipo selvagem (WT) foram produzidos como previamente descrito (Zhou et al., Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)). Ratinhos TG-1 foram gerados a partir dos fundadores originais h19-1 (C57BL/6 x B6/SJL), e foram cruzados com antecedentes C57BL/6 durante pelo menos 7 gerações. Ratinhos TG-2 foram gerados a partir dos fundadores originais h19-4 (C57BL/6 x B6/SJL). Depois de várias gerações de retrocruzamento. As células B foram obtidas de ratinhos TG-1^{+/+} os quais expressam a densidade de superfície celular de CD 19 humano a cerca da mesma densidade encontrada em células B humanas. Ratinhos expressando CD 19 humano foram descritos adicionalmente e usados como modelo em vários estudos (Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995); Sato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11558-11562 (1995); Sato et al., J. Immunol., 157:4371-4378 (1996); Tedder et al., Immunity, 6:107-118 (1997); Sato et al., J. Immunol., 158:4662-4669 (1997); Sato et al., J. Immunol., 159:3278-3287 (1997); Sato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:13158-13162 (1997); Inaoki et al., J. Exp. Med., 186:1923-1931 (1997); Fujimoto et al., J. Immunol., 162:7088-7094 (1999); Fujimoto et al., Immunity, 11:191-200 (1999); Satterthwaite et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA, 97:6687-6692 (2000); Fujimoto et al., Immunity, 13:47-57 (2000); Sato et al., J. Immunol., 165:6635-6643 (2000); Zipfel et al., J. Immunol., 165:6872-6879 (2000); Qian et al., J. Immunol., 166:2412-2419 (2001); Hasegawa et al., J. Immunol., 167:2469-2478 (2001); Hasegawa et al., J. Immunol., 167:3190-3200 (2001); Fujimoto et al., J. Biol. Chem., 276:44820-44827 (2001); Fujimoto et al., J. Immunol., 168:5465-5476 (2002); Saito et al., J. Clin. Invest., 109:1453-1462 (2002); Yazawa et al., Blood, 102:1374-80 (2003); Shoham et al., J. Immunol., 171:4062-4072 (2003)). Ratinhos deficientes em CD19 ($CD19^{-/-}$) e os outros animais da mesma ninhada de WT são também como previamente descrito (Engel et al., Immunity, 3:39-50 (1995)). A expressão de CD19 humano em ratinhos transgênicos mostrou baixar a expressão endógena de CD19 em ratinhos (Sato et al., J. Immunol., 157:4371-4378 (1996); e Sato et al., J. Immunol., 158:4662-4669 (1997)) e hipóteses visando esta diminuição da expressão endógena de CD19 em ratinhos foram também avaliadas (Shoham et al., J. Immunol., 171:4062-4072 (2003)). As densidades de expressão de CD19 em ratinhos transgênicos expressando CD19 humano foram também avaliadas (Sato et al., J. Immunol., 165:6635-6643 (2000)).

Ratinhos TG-1^{+/+} foram cruzados com ratinhos deficientes na cadeia γ comum (FcR γ) do FcR (recetor Fc), (FcR $\gamma^{-/-}$ B6.129P2-Fcerg1^{tm1}) da Taconic Farms (Germantown, NY) para gerar FcR $\gamma^{-/-}$ hCD19^{+/+} e animais da mesma ninhada de WT. Ratinhos hemizigóticos para um transgene c-Myc (Eu-cMycTG, C57B1/6J-TgN(IghMyc); The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram como descrito (Harris et al., J. Exp. Med., 167:353 (1988) e Adams et al., Nature, 318:533 (1985)). Ratinhos c-MycTG (antecedente B6/129) foram cruzados com ratinhos hCD19TG-1^{+/+} para gerar descendência cMycTG^{+/+}

hCD19TG-1^{+/-} hemizigótica como determinado por rastreo por PCR. Ratinhos Rag1^{-/-} (B6.129S7-Rag1^{tm1Mom}/J) eram de The Jackson Laboratorhory. Ratinhos deficientes em macrófagos foram gerados por injeções na veia da cauda de lipossomas encapsulados em clodronato (0,1 mL/10 gramas de peso corporal; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) em ratinhos C57BL/6 no dia -2, 1 e 4 de acordo com métodos padrão (Van Rooijen e Sanders, J. Immunol. Métodos, 174:83-93 (1994)). Todos os ratinhos foram alojados numa instalação de barreira específica livre de agentes patogénicos e usados primeiro às 6-9 semanas de idade.

ELISAs. Concentrações de Ig sérica foram determinadas por ELISA usando IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, e IgA de ratinho purificado por afinidade (Southern Biotechnology Associates, Inc.) para gerar curvas padrão conforme descrito (Engel et al., Immunity, 3:39 (1995)). Os níveis séricos de autoanticorpos IgM e IgG contra dsADN, ssADN e histona foram determinados por ELISA usando placas de microtitulação revestidas com ADN de timo de bezerro de cadeia dupla (ds) (Sigma-Aldrich), ADN de timo de bezerro fervido (que contém ADN de cadeia simples (ss)) ou histona (Sigma-Aldrich) como descrito (Sato et al., J. Immunol., 157:4371 (1996)).

Imunoterapia. Anticorpos do isotipo de controlo anti-CD19 estéreis e não reativos, (0,5-250 µg) em 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) foram injetados através das veias laterais da cauda. Todas as experiências usaram 250 µg de anticorpo a menos que indicado de outro modo. O número de leucócitos foi quantificado por hemocitómetro seguido por lise das células vermelhas, as frequências das células B B220⁺ foram determinadas por coloração com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. As

doses de anticorpo em humanos e ratinhos foram comparadas usando a Ferramenta Oncológica Calculadora de Dose (www.fda.gov/cder/cancer/animalframe.htm).

Imunizações. Ratinhos WT com dois meses de idade foram imunizadas i.p. com 50 µg de lipopolissacárido (LPS) conjugado a 2,4,6-trinitrofenil (TNP) (Sigma, St. Louis, MO) ou 25 µg de (DNP)-FICOLL® conjugado a 2,4-dinitrofenol (Biosearch Technologies, San Rafael, CA) em solução salina. Os ratinhos foram também imunizados i.p. com 100 µg de hemocianina de lapa buraco de fechadura conjugada a DNP (DNP-KLH, CALBIOCHEM®-NOVABIOCHEM® Corp., La Jolla, CA) em adjuvante de Freund completo e foram reforçados 21 dias mais tarde com DNP-KLH em adjuvante de Freund incompleto. Os ratinhos foram sangrados antes e depois das imunizações como indicado. Os títulos de anticorpos específicos para DNP ou TNP em amostras de soro individuais foram medidos em duplicado usando placas de ELISA revestidas com DNP-BSA (CALBIOCHEM®-NOVABIOCHEM® Corp., La Jolla, CA) ou TNP-BSA (Biosearch Technologies, San Rafael, CA) de acordo com métodos padrão (Engel et al., *Immunity*, 3:39-50 (1995)). Soros de ratinhos imunizados com TNP-LPS foram diluídos de 1:400, com soros de ratinhos imunizados com DNP-FICOLL® e DNP-BSA diluídos de 1:1000 para análise ELISA.

Estudos do Tumor. Tumor dos nódulos linfáticos espontâneo de um ratinho c-mycTG^{+/-} hCD19TG^{-1+/-} foi isolado e expandido *in vivo*. As células tumorais (10⁻⁵/ratinho) foram administradas i.v. a ratinhos recetores Rag^{-/-} ao dia 0, com FMC63 e mAbs controlo com isotipo correspondente (250 µg/mL) dados i.v. aos dias 1 e 7. Leucócitos sanguíneos de ratinhos recetores foram isolados semanalmente com o número de células CD19⁺ B220⁺ circulantes de ratinho quantificado por coloração com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo.

Análise Estatística. Todos os dados são mostrados como médias \pm SEM. O teste t de Student foi usado para determinar a significância das diferenças entre as médias das amostras.

6.2. EXEMPLO 1: EXPRESSÃO DE CD 19 HUMANO EM RATINHOS TRANSGÊNICOS

Os ratinhos hCD 19TG aqui descritos ou outros animais transgênicos expressando CD 19 humano podem ser usados para avaliar diferentes regimes terapêuticos compreendendo anticorpos anti-CD19 humanos, humanizados, ou quiméricos, tais como variações na concentração da dose, quantidade, ou temporização. A eficácia em pacientes humanos de diferentes regimes terapêuticos pode ser prevista usando os dois indicadores descritos a seguir, isto é, depleção das células B em certos fluídos e/ou tecidos corporais e a capacidade de um anticorpo anti-CD19 monoclonal humano ou humanizado para se ligar a células B. Regimes de tratamento que são efetivos em ratinhos transgênicos de CD19 humano podem ser usados com as composições e anticorpos para uso nos métodos da invenção para tratar malignidades das células B em humanos.

Para determinar se CD 19 humano foi expressado nas células B dos ratinhos transgênicos (TG-1^{+/-} hemizigóticos) expressando o transgene CD19 humano, as células B foram extraídas da medula óssea, sangue, baço e lavagem peritoneal desses ratinhos. A expressão de CD 19 humano e CD 19 de ratinho foi avaliada nestas células fazendo as células contactar com anticorpos anti-CD19 monoclonais de ratinho que se ligam a CD19. A ligação do anticorpo às células da linhagem B foi detetada usando coloração com

imunofluorescência de duas cores com análise de citometria de fluxo.

Os resultados são mostrados na **Fig. 1A** em gráficos da expressão de murino CD 19 detetada (mCD19) (eixo do x) plotado contra a expressão detetada de CD19 humano (hCD19) (eixo do y) para medula óssea (BM), sangue, baço e lavagem peritoneal (PL). As unidades dos eixos representam uma escala log de quatro décadas começando com 1 no canto inferior esquerdo. O anticorpo anti-CD19 B4 que se liga ao CD19 humano (Beckman/Coulter) foi usado para visualizar a expressão de CD19 humano e o anticorpo CD19 1D3 que se liga ao CD 19 de ratinho (PharMingen) foi usado para visualizar a expressão de CD19 de ratinho (também usado para as **Figs. 1B e 1C**). Enquanto a expressão do CD19 humano aumenta de forma incrementada durante o desenvolvimento das células B humanas, CD 19 de murino é expressado em altos níveis durante o desenvolvimento das células B de medula óssea de ratinho. A **Fig. 1A** mostra que a expressão de CD19 humano é paralela à expressão de CD19 de ratinho nas células B periféricas encontradas no sangue, baço e lavagem peritoneal (PL) demonstrando que o anticorpo anti-hCD19 de ratinho (que se liga a CD19 humano) liga-se às populações de células B periféricas. Adicionalmente, uma pequena população de células B derivadas da medula óssea (BM) expressam CD 19 endógeno de ratinho mas não CD19 humano (anticorpo anti-CD19 monoclonal de ratinho que liga a CD19 humano). Assim, as células B de medula óssea caem em duas categorias em ratinhos TG-1^{+/-} hemizigóticos, células da linhagem B madura que são hCD19⁺mCD19⁺ e células da linhagem B menos madura que são somente mCD19⁺ (**Fig. 1A**). Estes resultados são consistentes com os achados de Zhou et al. (Mol. Cell. Biol., 14:3884-3894 (1994)) que indicam que a expressão de CD19 humano nestes ratinhos transgênicos

correlaciona-se com a maturação das células B. Todas as células B maduras no sangue, baço, e cavidade peritoneal eram hCD19⁺ e mCD19⁺.

Os níveis de expressão relativos de mCD19 e hCD 19, como avaliado medindo a intensidade média da fluorescência (anti-CD de ratinho 19 para hCD19 e anti-CD19 de ratinho para mCD19) respectivamente, são mostrados na **Fig. 1B**. Entre ratinhos TG-1 homozigóticos para o transgene hCD19 (TG-1^{+/+}), a expressão de hCD19 nas células B do sangue era comparável à expressão de hCD19 em células B humanas. Para comparar as densidades relativas da expressão de hCD19 e mCD19 em linhas de ratinho transgênicos TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, e TG-2^{+/+}, as células B derivadas de sangue foram extraídas e analisadas quanto à expressão de CD19 como descrito acima. Os resultados são mostrados na **Fig. 1B** em histogramas mostrando a percentagem da expressão de CD 19 humano para as células B de sangue humano, células B de sangue dos ratinhos TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, e TG-2^{+/+} de hCD19TG (esquerda) e a percentagem de expressão de CD 19 de ratinho para células B de sangue de ratinho tipo selvagem (WT), células B de sangue CD19⁺ TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-}, e TG-2^{+/+} de ratinhos hCD19TG (direita). Os valores (valores lineares da intensidade de fluorescência média) representam a expressão da densidade média relativa de CD19 (\pm SEM) comparada com células B sanguíneas de humanos ou de ratinhos tipo selvagem (WT) (mostrado como 100%). Os resultados mostram que em ratinhos TG-1^{+/+} homozigóticos, as células B sanguíneas expressaram hCD19 a densidades como medido pelas intensidades de fluorescência médias cerca de 72% mais altas que as células B sanguíneas humanas. As células B sanguíneas em ratinhos TG-1^{+/-} expressaram hCD19 a densidades semelhantes às células B sanguíneas humanas, enquanto as células B sanguíneas nos ratinhos TG-2^{+/+} expressaram hCD 19 a

densidades 65% mais baixas que as células B sanguíneas humanas.

Outras comparações das densidades relativas da expressão de hCD19 e mCD19 nas células B dos tecidos de ratinho TG-1^{+/-} são mostradas na **Fig. 1C** em histogramas que mostram as intensidades de fluorescência médias (MFI±SEM) da coloração de anticorpo anti-CD19 para células B de medula óssea, sangue, baço, nódulo linfático, e PL para hCD19 (esquerda) e mCD19 (direita). Os resultados demonstram que em ratinhos TG-1^{+/-}, hCD19 foi expressado a níveis aumentados pelas células B220⁺ na medula óssea (63% de níveis sanguíneos humanos) < sangue (100%) < baço (121%) = nódulos linfáticos (120%) e < cavidade peritoneal (177%). A expressão de CD19 humano teve uma pequena influência na expressão de mCD19. Os níveis de mRNA para hCD19 e mCD19 não mudaram.

Para determinar se os anticorpos anti-hCD19 de ratinho (que se ligam a CD19 humano) dos isotipos IgG1 (HB12a, HB12b, B4), IgG2a (FMC63) e IgG2b (HD237) reagem diferentemente, as células B B220⁺ do sangue e baço foram isoladas de ratinhos TG-1^{+/-}. As células isoladas foram contactadas *in vitro* com os anticorpos anti-CD19 acima mencionados e avaliadas quanto à sua capacidade para se ligarem a células B de ratinho transgênico expressando CD 19 humano (hCD 19TG) usando coloração de anticorpo monoclonal a qual foi visualizada usando anticorpos secundários conjugados a PE específicos do isotipo com análise de citometria de fluxo.

Os resultados são mostrados na **Fig. 1D** em gráficos da intensidade de fluorescência (eixo do x) versus o número relativo de células B (eixo do y) para anticorpos anti-CD19 IgG2b (isotipo murino), IgG2a (isotipo murino), e IgG1 (isotipo murino) a 5 µg/mL. A intensidade de fluorescência

de células B220⁺ coradas com anticorpo anti-CD19 são mostradas como linhas sólidas e a intensidade de fluorescência do controlo de isotipo correspondente (CTL) é mostrada como uma linha tracejada. Cada anticorpo atingiu níveis de saturação de reatividade com células B de baço a uma concentração de 5 µg/mL. Os resultados demonstram que a densidade de ligação a anticorpo anti-CD19 nas células B B220⁺ de sangue e baço de ratinho dos ratinhos TG-1^{+/-} é uniforme para os isotipos de anticorpo testados e para ambas as células B do sangue e do baço.

Para determinar se as intensidades de fluorescência médias eram independentes do isotipo de anticorpo anti-CD19, a atividade de ligação de anticorpos anti-CD19 individuais (a 5 µg/mL) foi avaliada por coloração de uma linha de pré-células B de ratinho, 300.19, transfetadas com um cADN de hCD 19 usando o mesmo anticorpo secundário de Ig anti-ratinho. A coloração de anticorpo (MFI±SEM) foi visualizada usando anticorpo secundário conjugado a PE específico de Ig de ratinho com análise de citometria de fluxo. Os resultados são mostrados na **Fig. 1E** num histograma de anticorpo anti-CD19 de ligação a células hCD19 300.19 transfetadas com cADN (como mostrado pela intensidade de coloração, eixo do y), para anticorpos anti-CD19 HB12a, HB12b, B4, FMC63, HD237 e um anticorpo controlo (CTL). Cada anticorpo corou as células com intensidades de fluorescência médias características que foram independentes do isotipo de anticorpo anti-CD19, com HB12b mostrando os níveis mais baixos de coloração e HD237 demonstrando o mais alto. Assim, os resultados mostrados demonstram que as células 300.19 são um sistema de modelo *in vitro* para comparação da capacidade dos anticorpos anti-CD19 se ligarem a CD19 *in vitro*.

Assim, tudo considerado, os resultados mostrados na **Fig. 1** demonstram que ratinhos hCD 19TG e as células 300.19 representam sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo* apropriados para avaliar a capacidade dos anticorpos anti-hCD19 se ligarem às células B quando hCD19 é expresso numa gama de densidades.

As **Figs. 1A-D** representam os resultados obtidos com ≥ 3 ratinhos de cada genótipo.

6.2. EXEMPLO 2: DEPLEÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD19 DE CÉLULAS B *IN VIVO*

Anticorpos anti-CD19 de ratinho (que se ligam a CD19 humano) foram avaliados quanto à sua capacidade de depletar células B hCD19TG (TG-1^{+/-}) de sangue, baço, e nódulo linfático *in vivo*. Cada anticorpo foi dado a ratinhos a 250 ou 50 µg/ratinho, uma dose única de cerca de 10 até 50 vezes inferior à dose 375 mg/m² primariamente dada quatro vezes para terapia anti-CD20 em humanos (Maloney et al., J. Clin. Oncol., 15:3266-74(1997) e McLaughlin et al., 12:1763-9 (1998)).

Os resultados são mostrados na **Fig. 2A** num gráfico de contagem das células B 7 dias depois do tratamento com CD 19 ou com controlo de isotipo correspondente (CTL) com anticorpos anti-CD19 HB12a, HB12b, ou FMC63 ou um controlo. São fornecidos gráficos para tecidos de nódulos linfáticos, baço e sangue para cada anticorpo anti-CD19. A percentagem de linfócitos entre os limites depletados aos 7 dias mostrada em cada gráfico demonstra depleção representativa das células B do sangue, baço e nódulos linfáticos de ratinhos TG-1^{+/-} como determinado por coloração com

imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. A **Fig. 2B** mostra números médios (\pm SEM por mL) de células B sanguíneas B220⁺ após tratamento com anticorpos anti-CD19 (círculos fechados) ou controle de isotipo (círculos abertos). O valor mostrado após o tempo 0 representa dados obtidos à 1 hora. A **Fig. 2C** e a **Fig. 2D** mostram os números de células B de baço e nódulos linfáticos (\pm SEM), respectivamente, após tratamento de ratinhos TG-1^{+/-} com anticorpo anti-CD19 (barras preenchidas) ou controle (barras abertas) às doses indicadas. Nas Figs. **2B-D**, diferenças significativas entre resultados médios para ratinhos tratados com anticorpo anti-CD19 controle ou de isotipo (≥ 3 ratinhos por ponto de dados) são indicadas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, em comparação com controles.

Cada anticorpo depletou a maioria das células B circulantes dentro de uma hora de tratamento (**Fig. 2B**), com efeitos potentes de depleção nas frequências das células B de baço e nódulos linfáticos (**Fig. 2A**) e nos números (**Figs. 2C-D**) ao dia sete. O anticorpo HB 12a depletou 98% das células B sanguíneas e 90-95% das células B esplénicas e de nódulos linfático ao dia sete. Do mesmo modo, os anticorpos HB12b, B4, FMC63, e HD237 depletaram 99%, 96%, 99%, e 97% das células B sanguíneas, respectivamente. Os anticorpos HB12b, B4, FMC63, e HD237 depletaram 88-93%, 64-85%, 72-95%, e 88-90% das células B esplénicas e de nódulos linfáticos, respectivamente. As poucas células B periféricas restantes primariamente representaram células fenotipicamente imaturas que eram emigrantes potenciais da medula óssea. Nenhum dos anticorpos CD 19 teve efeitos significativos quando dados a ratinhos WT, e anticorpos de controle de isotipo correspondente dados sob condições idênticas não afetaram os números de células B (**Figs. 2A-D**). Assim, os anticorpos anti-hCD19 depletaram efetivamente as células B

da circulação, baço e nódulos linfáticos de ratinhos hCD19TG ao dia sete. Um resumo da depleção das células B em ratinhos TG-1^{+/+} é fornecido na Tabela 1.

TABELA 1

Tecido	Subconjunto B ^a	mAb Controlo ^b	mAb CD19	% Depleção
BM:	B220 ⁺	3,41±0,57 (11)	0,82±0,13(11)	76**
	Pró-B	0,75±0,1 (5)	0,97±0,22 (5)	0
	Pré-B	1,74±0,58 (5)	0,10±0,01 (5)	94**
	imaturo	0,70±0,16 (5)	0,04±0,01 (5)	93**
	maduro	0,86±0,14 (5)	0,004±0,0004 (5)	99**
Sangue:	B220 ⁺	0,822±0,14 (11)	0,004±0,0006	99**
Baço:	B220 ⁺	25,2±2,2 (11)	1,7±0,2 (11)	93**
LN:	B220 ⁺	0,89±0,11 (11)	0,06±0,01 (11)	93**
Peritoneu :	B220 ⁺	1,16±0,11 (11)	0,37±0,03 (11)	68**
	B1a	0,86±0,12 (5)	0,31±0,06 (5)	61**
	B2	0,34±0,06 (5)	0,08±0,02 (5)	73**

^a Os subconjuntos de células B foram: medula óssea (BM) pró-B (CD43⁺IgM⁺B220^{lo}), pré-B (CD43⁻ IgM⁻B220^{lo}); B imaturas (IgM⁺B220^{lo}), B maduras (IgM⁺B220^{hi}); B1a peritoneal (CD5⁺B220^{lo}), B2 (CD5⁻B220^{hi}).

^bValores (±SEM) indicam números de célula (x 10⁻⁶) presentes em ratinhos sete dias após tratamento com anticorpo (250 µg). Valores BM são para fêmures bilaterais. Números no sangue por/mL. Números LN são para nódulos inguinais e axilares bilaterais. Os números de ratinho são indicados entre parênteses. Diferenças significativas entre médias são indicadas; *p<0,05, **p<0,01.

6.3.1. DEPLEÇÃO DAS CÉLULAS B DE MEDULA ÓSSEA

Anticorpos anti-CD19 conhecidos foram testados em ratinhos hCD19TG para determinar se esses anticorpos eram eficazes a depletar células B dos vários fluídos e tecidos corporais. Os ensaios aqui descritos podem ser usados para determinar se outros anticorpos anti-CD19, por exemplo, anticorpos anti-CD19 que se ligam a porções específicas do antigénio

CD19 humano, vão depletar eficazmente as células B. Os resultados usando anticorpos anti-CD19 identificados como capazes de depletar células B podem ser correlacionados com uso em humanos. Anticorpos com propriedades dos anticorpos identificados podem ser usados nas composições e métodos da invenção para uso no tratamento de malignidades das células B em humanos. As Figs. **3A-3F** ilustram a depleção das células B na medula óssea após tratamento com anticorpo CD 19.

A **Fig. 3A** mostra gráficos da intensidade de fluorescência (eixo do x) versus o número de células B relativo (eixo do y) para expressão de hCD19 e mCD19 por subpopulações de células B de medula óssea TG-1^{+/-} avaliado por coloração de quatro cores com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo das células com propriedades de dispersão para a frente e lateral dos linfócitos. Células pró-B foram definidas como CD43+IgM-B220^{lo}, células pré-B foram CD43-IgM-B220^{lo}, células B imaturas foram IgM+B220^{lo} e células B maduras foram IgM+B220^{hi}. Os gráficos de barras (direita) mostram valores médios relativos de MFI (\pm SEM) para expressão de CD19 por cada subconjunto de células B (≥ 3 ratinhos/ponto de dados). Como em ratinhos hCD19TG (**Fig. 1A**), a expressão de CD19 é heterogênea em humanos à medida que as células B maturam e saem da medula óssea. Apenas uma pequena fração de pró-células B (20%, CD43^{hi}IgM-B220^{lo}) expressaram hCD19 em ratinhos TG-1^{+/-}, enquanto a maioria das células pré B eram hCD19+ e a maioria das células B maduras na medula óssea expressaram hCD19 a níveis relativamente altos. Metade das pró-células B (55%, IgM-B220⁺) expressaram mCD19 em ratinhos TG-1^{+/-}, enquanto mCD19 foi expressado pela maioria das células pré-B e células B maduras na medula óssea a níveis relativamente elevados.

A **Fig. 3B** mostra a depleção de células hCD 19+ em ratinhos hCD 19TG sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 ou controlo de isotipo correspondente (250 µg) avaliada por coloração de duas cores com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. Os números representam a frequência relativa de células dentro dos limites indicados. Os resultados representam aqueles obtidos com três pares de animais da mesma ninhada de cada genótipo de ratinho. Após tratamento com anticorpo CD 19, a grande maioria das células hCD19+ na medula óssea de ratinhos TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-} e TG-2^{+/+} foram depletadas pelo anticorpo FMC63 dado a 250 µg/ratinho.

A **Fig. 3C** mostra depleção representativa das células B B220⁺ sete dias após tratamento com anticorpo anti-CD19 ou controlo de isotipo correspondente (250 µg) de ratinhos TG-1^{+/-}. Os valores dos gráficos de barras representam o número total (±SEM) de células B220⁺ dentro dos fêmures bilaterais de ratinhos tratados com anticorpo. Diferenças significativas entre as médias das amostras (≥ 3 ratinhos por grupo) são indicadas; *p<0,05, **p<0,01. Inesperadamente, uma grande fração de células pré-B mCD19⁺ que expressaram hCD19 a níveis baixos até indetetáveis foram também depletadas da medula óssea. Consistente com isto, os anticorpos FMC63, HB12a, HB12b, B4 e HD237 depletaram a maioria das células B220⁺ da medula óssea.

A **Fig. 3D** mostra a depleção representativa do subconjunto de células B da medula óssea sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 ou controlo de isotipo correspondente (250 µg) de ratinhos TG-1^{+/-} como avaliado com coloração de três cores com imunofluorescência. Células IgM-B220¹⁰ pró-/ pré-B foram ainda subdivididas com base na expressão de CD43 (painéis inferiores). A **Fig. 3E** mostra depleção

representativa ou células pré-B CD25+B220^{lo} da medula óssea sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 ou controle de isotipo correspondente (250 µg) das linhas de ratinhos hCD19TG como avaliado por coloração de duas cores com imunofluorescência. Os resultados são de experiências realizadas em diferentes dias e portanto os limites não foram idênticos. Quando as subpopulações individuais de medula óssea foram analisadas, a maioria das pró-células B CD43^{hi}IgM-B220^{lo} (**Fig. 3D**) não foram afetadas pelo tratamento com anticorpo FMC63 em ratinhos TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-} ou TG-2^{+/+}, enquanto a maioria das células pré-B CD25+CD43^{lo}IgM-B220^{lo} (**Fig. 3E**) foram depletadas. A **Fig. 3F** mostra gráficos de barras indicando os números (±SEM) de células pró-B, pré-B, imaturas, e maduras B dentro de fêmures bilaterais sete dias após tratamento com anticorpo FMC63 (barras preenchidas) ou controle (barras abertas) de ≥ 3 pares de animais da mesma ninhada. Os resultados demonstram que a maioria das células B imaturas e maduras foram também depletadas da medula óssea de ratinhos TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-} e TG-2^{+/+}. Assim, a maioria das células hCD19⁺ foram depletadas da medula óssea por tratamento com anticorpo CD19, incluindo células pré-B que expressam hCD19 a níveis baixos.

6.3.2. DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B PERITONEAIS

As células B da cavidade peritoneal em ratinhos TG-1^{+/-} expressam hCD19 a níveis mais altos do que células B de outros tecidos (**Fig. 1A e Fig. 1C**), primariamente devido à presença de células CD5⁺IgM^{hi}B220^{lo}-B1 que expressam hCD19 a densidades aproximadamente 25% superiores às do subconjunto CD5⁻ IgM^{lo}B220^{hi} de células B (B2) convencionais (**Fig. 4A**). As **Figs. 4B-4C** demonstram que as células B da cavidade

peritoneal são sensíveis ao tratamento com anticorpo anti-CD19.

A **Fig. 4A** mostra gráficos da expressão de CD 19 humano e de ratinho (eixo do x) versus o número relativo de células B da cavidade peritoneal CD5⁺B220⁺ B1a e CD5-B220^{hi} B2 (convencionais) (eixo do y). Suspensões de célula única de linfócitos da cavidade peritoneal foram examinadas por coloração de três cores com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. Os gráficos de barras representam valores de MFI médios (\pm SEM) para a expressão de CD 19 por 3 pares de animais da mesma ninhada de ratinhos TG-1^{+/-}.

A **Fig. 4B** mostra a depleção das células B220⁺ da cavidade peritoneal de ratinhos TG-1^{+/-} tratados com anticorpos CD 19 (HB12a, HB12b, e FMC63 a 250 μ g; B4 e HD237 a 50 μ g) ou anticorpo de controlo (250 μ g). Os números representam as frequências relativas das células B220⁺ dentro dos limites indicados ao dia sete. Os valores dos gráficos de barras representam o número total (\pm SEM) de células B220⁺ no peritoneu de ratinhos tratados com anticorpo (\geq 3 ratinhos por grupo). Diferenças significativas entre as médias das amostras são indicadas; *p<0,05, **p<0,01. Os resultados demonstram que o tratamento com anticorpo anti-CD19 a 250 μ g/ratinho depletou uma porção significativa das células B B220⁺ peritoneais ao dia sete. Os resultados mostrados na Fig. 4B são em parte explicados pela depleção das células B1 e B2 convencionais. Quando hCD19 foi expressado nas densidades mais elevadas em ratinhos TG-1^{+/+}, a maioria das células B1 e B2 foram depletadas. No entanto, a depleção mediada por CD19 das células B1 e B2 foi menos eficaz em ratinhos TG-1^{+/-} e TG-2^{+/+} em que os níveis de hCD19 eram inferiores. Assim, o tratamento com anticorpo CD19 depletou células B1 e B2 peritoneais dependendo da sua densidade de

expressão de CD19 como avaliado usando intensidade de fluorescência média, embora as células B peritoneais fossem mais resistentes à depleção mediada por anticorpo anti-CD19 do que células B de baço e nódulos linfáticos.

A **Fig. 4C** mostra a depleção representativa das células B $CD5^+B220^+$ B1a e $CD5-B220^{hi}$ B2 sete dias após tratamento com anticorpo anti-CD19 ou anticorpo de controlo de ratinhos hCD19TG. Os números representam as frequências relativas de cada subconjunto de células B dentro dos limites indicados. Os valores do gráfico de barras representam o número total (\pm SEM) de cada subconjunto de células dentro do peritoneu de ratinhos tratados com anticorpo (≥ 3 ratinhos por grupo). Diferenças significativas entre médias de amostras são indicadas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

6.3.3. ANTICORPOS ANTI-CD19 DISTINTOS MEDEIAM A ELIMINAÇÃO DE CÉLULAS B

Para determinar se anticorpos anti-CD19 HB12a e HB12b são distintos de anticorpos anti-CD19 conhecidos, a sequência de aminoácidos de cada região variável do anticorpo anti-CD19 aqui usado foi analisada (**Figs. 5A e 5B, 6A e 6B, 7A e 7B**).

A **Fig. 5A** ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:1) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:2) para as sequências juncionais da cadeia pesada V_H -D- J_H do anticorpo anti-CD19 HB12a. As sequências que se sobrepõem com o primer de PCR 5' são indicadas com sublinhado duplo e podem variar da sequência de ADN real uma vez que foram usados primers redundantes. Fronteiras juncionais aproximadas entre as sequências V, D, e J são designadas nas sequências por barras verticais (|). Nucleótidos em letras minúsculas

indicam adições de nucleótidos nas fronteiras juncionais ou sítios potenciais para hipermutação somática. O resíduo amino-terminal do anticorpo (E) é marcado como resíduo 1.

A **Fig. 5B** ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:3) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:4) para sequências juncionais da cadeia pesada V_H -D- J_H do anticorpo anti-CD19 HB12b. As sequências que se sobrepõem com o primer de PCR 5' são indicadas com sublinhado duplo e podem variar da sequência de ADN real uma vez que primers redundantes são usados. Fronteiras juncionais aproximadas entre as sequências V, D, e J são designadas nas sequências por barras verticais (|). Nucleótidos em letras minúsculas indicam adições de nucleótidos nas fronteiras juncionais ou sítios potenciais para hipermutação somática. O resíduo amino-terminal do anticorpo (E) é marcado como resíduo 1.

A **Fig. 6A** ilustra as sequências da sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:15) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:16) para as sequências juncionais da cadeia leve V_k - J_k do anticorpo anti-CD19 HB12a. A **Fig. 6B** ilustra as sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:17) e de aminoácidos previstas (SEQ ID NO:18) para sequências juncionais de cadeia leve V-J do anticorpo anti-CD19 HB12b. Os aminoácidos amino-terminais das proteínas maduras secretadas deduzidas por análise da sequência de aminoácidos são numerados como número 1. As sequências que se sobrepõem com o primer PCR 3' são indicadas com sublinhado duplo. As fronteiras juncionais previstas para as regiões V-J-C são indicadas (/) com os nucleótidos da região J representando sítios potenciais para hipermutação somática a negrito.

As **Fig. 7A** e **7B** ilustram o alinhamento da sequência de aminoácidos de anticorpos anti-CD19 de ratinho publicados.

A **Fig. 7A** mostra um alinhamento de sequência para as sequências juncionais de cadeia pesada V_H -D- J_H incluindo uma sequência de consenso (SEQ ID NO:5), HB12a (SEQ ID NO:2), 4G7 (SEQ ID NO:6), HB12b (SEQ ID NO:4), HD37 (SEQ ID NO:7), B43 (SEQ ID NO:8), e FMC63 (SEQ ID NO:9). A numeração dos aminoácidos e designação das origens das sequências codificantes para cada região V, D e J do anticorpo são de acordo com métodos convencionais (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest., U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD (1991)) em que as posições de aminoácidos 1-94 e as regiões determinantes de complementaridade CDR1 e 2 são codificadas por um gene de V_H . Um traço indica um espaço inserido na sequência para maximizar o alinhamento das sequências de aminoácidos semelhantes. Um ponto indica a identidade entre cada anticorpo anti-CD19 e a sequência de aminoácidos de consenso para todos os anticorpos. As regiões CDR são evidenciadas para clareza. A Fig. 7B mostra a análise da sequência de aminoácidos da cadeia leve V_k dos anticorpos anti-CD19. As sequências de consenso (SEQ ID NO:10), HB12a (SEQ ID NO:16); HB12b (SEQ ID NO:18); HD37 (SEQ ID NO:11), B43 (SEQ ID NO:12), FMC63 (SEQ ID NO:13), e 4G7 (SEQ ID NO:14) são alinhadas. A numeração dos aminoácidos e a designação das origens da sequência codificante para cada anticorpo anti-CD19 é de acordo com métodos convencionais (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest., U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD). Os aminoácidos a seguir ao sítio de clivagem da sequência de sinal prevista são numerados 1. Um traço indica um espaço inserido na sequência para maximizar o alinhamento das sequências de aminoácidos semelhantes. As regiões CDR são evidenciadas (na caixa) para clareza.

Uma vez que cada anticorpo anti-CD19 examinado neste estudo depleta números significativos de células B *in vivo*, a

sequência de aminoácidos de cada região variável do anticorpo anti-CD19 foi avaliada para determinar se estes anticorpos diferem na sequência e potencialmente se ligam a diferentes epitopos de CD 19. Os anticorpos ligam-se a antígenos alvo através de interações moleculares que são mediadas por aminoácidos específicos dentro das regiões variáveis de cada molécula de anticorpo. Assim, as interações complexas entre antígenos de proteína e os anticorpos que se ligam a epitopos específicos nestes antígenos são quase únicas para cada anticorpo e a sua sequência de aminoácidos específica. Este nível de complexidade nas interações de antígeno e anticorpo é um reflexo de um repertório de anticorpos diverso para a maioria dos antígenos de proteína. Enquanto as interações de anticorpos com antígenos alvo são primariamente mediadas por aminoácidos dentro das regiões determinantes de complementaridade (CDR) das moléculas de anticorpo, aminoácidos de estrutura são também críticos para a atividade de ligação a antígeno. Assim, anticorpos estruturalmente semelhantes vão provavelmente ligar-se aos mesmos antígenos ou região de uma molécula alvo, enquanto os anticorpos estruturalmente diferentes com diferentes regiões V e CDR vão provavelmente interagir com regiões diferentes dos antígenos através de diferentes interações moleculares.

Uma vez que os anticorpos que interagem com e se ligam à mesma região molecular (ou epitopo) de um antígeno alvo são estruturalmente semelhantes por definição, as sequências de aminoácidos de HB12a, HB12b, FMC63 e outros anticorpos anti-CD19 publicados foram comparadas incluindo os anticorpos HD37 (Kipriyanov et al., J. Immunol. Methods, 196:51-62(1996); Le Gall et al., FEBS Letters, 453:164-168 (1999)), 2G7 (Meeker et al., Hybridoma, 3:305-320 (1984); Brandl et al., Exp. Hematol., 27:1264-1270 (1999)), e B43

(Bejcek et al., Cancer Res., 55:2346-2351 (1995)). As cadeias pesadas dos anticorpos anti-CD19 foram geradas através de diferentes combinações de segmentos de genes V(D)J com as regiões V derivadas dos segmentos de genes V1S39, V1S56, V1S136, ou V2S1, regiões D derivadas dos segmentos de genes FL16.1, e regiões J derivadas de segmentos de genes J2 ou J4 (**Tabela 2**). As regiões variáveis de cadeia pesada e leve publicadas dos anticorpos B43 e HD37 foram virtualmente idênticas na sequência de aminoácidos (**Figs. 7A-B**). Este nível de conservação reflete o facto de cada um destes anticorpos ser também notavelmente semelhantes ao nível dos nucleótidos, tendo junções $V_H(D)J_H$ e V_LJ_L idênticas, com a maior parte das diferenças representadas pelo uso de primers redundantes para amplificar por PCR cada sequência de cADN. Isto indica que HD37 e B43 e os anticorpos partilham uma origem comum, se não idêntica, e portanto ligam-se a epitopos idênticos na proteína CD 19. Os anticorpos HB12a e 4G7 foram também distintos de outros anticorpos anti-CD19. Embora as regiões da cadeia pesada dos anticorpos HB12a e 4G7 fossem semelhantes e provavelmente derivadas da mesma linha germinal de segmentos de genes $V_H(D)J_H$, diferentes fronteiras juncionais foram usadas para a montagem de D- J_H (**Fig. 7A**). O anticorpo HB12b utilizou um segmento de gene V_H distinto (**Tabela 2**) e tinha sequências CDR3 distintamente diferentes (**Fig. 7A**) dos outros anticorpos anti-CD19. O anticorpo FMC63 também tinha uma sequência de aminoácidos muito distinta dos outros anticorpos anti-CD19.

TABELA 2

	Cadeia pesada				Leve Cadeia		
	V^a	D	J	Acesso # ^b	V	J	Acesso #
					V1-133*	J2*	
HB12a	V1S136 (12,8)	FL16.1	J2		01	01	
						J4 *	

	Cadeia pesada				Leve Cadeia		
	V ^a	D	J	Acesso # ^b	V	J	Acesso #
HB12b	V1S56 (27,14)	FL16.1	J2		V3-2*01	01	
4G7	V1S136 (10,8)	F16.1	J2	AJ555622	V2-137	J5	AJ555479
B43	V1S39 (37,17)	FL16.1	J4	S78322	V3-4	J1	S78338
HD37	V1S39 (34,16)	FL16.1	J4	X99230	V3-4	J1	X99232
FMC63	V2S1 (20,16)	FL16.1	J4	Y14283	V10-96	J2	Y14284
N.D., não determinado.							
^a Números dentro de parênteses indicam o número de diferenças de nucleótidos entre o gene codificante do anticorpo CD19 e a sequência de linha germinal mais homóloga identificada em bases de dados atuais, excluindo regiões de sobreposição com primers de PCR.							
^b Números de acesso do GENBANK® para sequências genéticas.							

Como mostrado na **Fig. 7B**, os anticorpos HB12a, HB12b, FMC63, 4G7, e HD37/B43 cada um utiliza genes de cadeia leve distintos (**Fig. 7B**). As cadeias leves foram geradas a partir de múltiplos segmentos de genes V e J. A falta de homogeneidade entre as sequências das cadeias H e L destes seis anticorpos anti-CD19 sugerem que estes anticorpos se ligam a vários sítios distintos no CD19 humano. Uma comparação das sequências de aminoácidos de cadeias pesadas e leves emparelhadas indicam adicionalmente que a maioria destes anticorpos anti-CD19 são estruturalmente distintos e vão portanto ligar-se a CD 19 humano através de diferentes interações moleculares. Deste modo, a capacidade de anticorpos anti-CD19 depletarem células B *in vivo* não está restringida a um número limitado de anticorpos que se ligam a CD19 em sítios idênticos, mas é uma propriedade geral dos anticorpos anti-CD19 como uma classe.

6.3.4. A DENSIDADE DE CD19 INFLUENCIA A EFICÁCIA DA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B INDUZIDA POR ANTICORPOS CD19

Para determinar se a capacidade de um anticorpo anti-CD19 para depletar células B é dependente da densidade de CD 19,

os anticorpos anti-CD19 HB 12b e FMC63 foram administrados a ratinhos com níveis variáveis de expressão de CD 19. Os resultados demonstram que a densidade de CD 19 humano em células B e o isotipo do anticorpo podem influenciar a depleção das células B na presença de um anticorpo anti-CD19. O mesmo ensaio pode ser usado para determinar se outros anticorpos anti-CD19 podem eficazmente depletar células B e os resultados podem ser correlacionados com o tratamento de pacientes humanos com níveis variáveis de expressão de CD19. Assim, os métodos para examinar a presença de CD 19 e a densidade em indivíduos humanos descritos na Secção 5.5.3 podem ser usados para identificar pacientes ou populações de pacientes para as quais certos anticorpos anti-CD19 podem depletar células B e/ou para determinar doses adequadas.

Os resultados apresentados acima indicam que embora todos os cinco anticorpos anti-CD19 testados fossem semelhantemente eficazes em ratinhos TG-1^{+/-} quando usados a 250 ou 50 µg, a extensão da depleção de células B para células B do sangue, medula óssea e baço parece correlacionar-se com o isotipo do anticorpo, IgG2a>IgG1>IgG2b (**Figs. 2A-2D**). Portanto, a eficácia dos anticorpos HB12b (IgG1) e FMC63 (IgG2a) foi comparada em ratinhos TG-1^{+/+} homozigóticos, TG-1^{+/-} heterozigóticos e TG-2^{+/+} homozigóticos que expressam CD19 a diferentes densidades (**Figs. 1A-E**).

Para determinar se a densidade de CD 19 influencia a eficácia da depleção representativa das células B induzida por anticorpos anti-CD19, a depleção de células B do sangue e baço foi examinada em ratinhos hCD 19TG após tratamento com anticorpo HB 12b (**Fig. 8A**) ou FMC63 (**Fig. 8B**) (7 dias, 250 µg/ratinho). Os números indicam a percentagem de

linfócitos B220⁺ entre os limites. Os gráficos de barras indicam números (\pm SEM) de células B do sangue (por mL) ou do baço (número total) após tratamento com anticorpos anti-CD19 (barras fechadas) ou anticorpos de controle do isotipo (barras abertas). Diferenças significativas entre resultados médios para ratinhos tratados com anticorpo anti-CD19 ou anticorpo de controle de isotipo (≥ 3 ratinhos por ponto de dados) são indicadas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Os resultados apresentados nas Figs. **8A-8D** demonstram que a densidade de CD 19 influencia a eficácia da depleção das células B por anticorpos anti-CD19 *in vivo*. O baixo nível de expressão de CD19 em ratinhos TG-2^{+/+} teve uma marcada influência na depleção das células B circulantes ou de tecidos pelo anticorpo HB12b ao dia sete (**Fig. 8A**). As diferenças na expressão de CD19 por ratinhos TG-1^{+/+}, TG-1^{+/-} e TG-2^{+/+} também influenciaram a depleção das células B circulantes e de tecidos pelo anticorpo FMC63 mas não alteraram significativamente a depleção das células B circulantes (**Fig. 8B**).

Para verificar adicionalmente se a densidade de CD 19 é um fator importante na depleção de células B mediada por mAb CD 19, as taxas de depleção relativas de células B CD19TG-1^{+/+} e CD19TG-2^{+/+} foram comparadas diretamente. Esplenócitos de ratinhos CD19TG-1^{+/+} e CD19TG-2^{+/+} foram marcados diferencialmente com CFSE através da marcação de esplenócitos não fracionados de ratinhos hCD19TG-1^{+/+} e hCD19TG-2^{+/+} foram marcados com 0,1 e 0,01 μ M de Vybrant™ CFDA SE (CFSE; Molecular Probes), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. A frequência relativa de células B220⁺ entre esplenócitos marcados com CFSE foi determinada por coloração com imunofluorescência com análise de citometria de fluxo. Subsequentemente, números

iguais de esplenócitos B220⁺ hCD19 TG-1^{+/+} e hCD19 TG-2^{+/+} marcados com CFSE ($2,5 \times 10^5$) foram injetados na cavidade peritoneal de três ratinhos B6 de tipo selvagem. Após 1 hora, foram dados aos ratinhos FMC63 ou mAb de controle (250 µg, i.p.). Após 24 horas, os linfócitos marcados foram recuperados com as frequências relativas de células B220⁺ e B220⁻ marcadas com CFSE avaliadas por citometria de fluxo. Os limites em cada histograma na **Fig. 8C** indicam as frequências de células B220⁺ dentro das populações de esplenócitos CD19TG-1^{+/+} (CFSE^{high}) e CD19TG-2^{+/+} (CFSE^{low}). O gráfico de barras indica o número da população de células marcadas com CFSE presentes em ratinhos tratados com mAb anti-CD19 em relação a ratinhos tratados com mAb de controle. Os resultados representam esplenócitos hCD19TG-1^{+/+} (barras preenchidas) e esplenócitos hCD19TG-2^{+/+} (barras abertas) transferidos para os ≥3 ratinhos recetores de tipo selvagem, com diferenças significativas entre as médias das amostras (±SEM) indicadas; **p<0,01.

A eliminação de células B foi avaliada durante 24 horas após tratamento com anti-CD19 ou com mAb de controle de ratinhos individuais. As células B CD19 TG-1^{+/+} B220⁺ foram depletadas a taxas significativamente mais rápidas (p<0,01) do que as células B CD19 TG-2^{+/+} em ratinhos tratados com mAb anti-CD19 em comparação com ratinhos tratados com mAb de controle (**Fig. 8C**). Além disso, a frequência relativa das células B B220⁺ CD19 TG-1^{+/+} para células B B220⁺ CD19 TG-2^{+/+} em ratinhos tratados com mAb anti-CD19 foi significativamente mais baixa (p<0,01) do que a proporção de células B B220⁺ CD19 TG-1^{+/+} para células B B220⁺ CD19 TG-2^{+/+} em ratinhos tratados com mAb de controle. Do mesmo modo, os números de células B220⁻ CD19TG-1^{+/+} e CD19TG-2^{+/+} marcadas com CFSE em ratinhos anti-CD19 ou mAb de controle foram também comparáveis. Assim, as células B CD19 TG-1^{+/+}

que expressam alta densidade de CD19 foram depletadas a uma taxa mais rápida do que células B CD19 TG-2^{+/+} que expressam CD 19 a uma densidade baixa.

A **Fig. 8D** mostra a intensidade de fluorescência de células B220⁺ coradas com anticorpos CD 19 (linhas grossas), CD20 (linhas finas) ou controle de isotipo correspondente (CTL, linhas tracejadas) (5 µg/mL), com a coloração do anticorpo visualizada usando anticorpo secundário conjugado com PE específico para isotipo com análise de citometria de fluxo. Os resultados representam aqueles obtidos em 4 experiências. Os resultados mostram as densidades de ligação a anticorpo anti-hCD19 e anti-mCD20 relativas em células B B220⁺ do baço de ratinhos TG-1^{+/-}. A densidade de ligação a anticorpo anti-mCD20 foi 10-64% tão alta como a ligação de anticorpo anti-CD19 independentemente do isotipo de anticorpo que foi usado para cada anticorpo (**Fig. 8D**). Embora a expressão de mCD20 tenha sido geralmente inferior à expressão de hCD19, os níveis de expressão de hCD19 em ratinhos TG-1^{+/-} são ainda assim comparáveis aos níveis de expressão de hCD19 encontrados em células B humanas (**Fig. 1B**). Assim, anticorpos anti-CD19 depletam eficazmente células B TG-2^{+/+} que expressam hCD19 a densidades relativamente baixas (**Fig. 1B**), embora níveis elevados de expressão de CD19 por células B TG-1^{+/+} e TG-1^{+/-} ofusquem as diferenças relativas na eficácia dos anticorpos IgG2a e IgG1. Embora haja uma correlação inversa direta entre o número de células B e a densidade da expressão de hCD 19 em ratinhos transgênicos TG-1 e TG-2, a densidade de hCD19 é um fator importante que contribui para a depleção das células B. Os níveis de anticorpo anti-CD19 foram saturados quando administrados a 250 µg/ratinho (*ver, também, níveis de saturação na Fig. 12*). Assim, os níveis de anticorpo

anti-CD19 livre foram em excesso independentemente do número de células B.

6.4. EXEMPLO 3: A DEPLEÇÃO DAS CÉLULAS B DE TECIDOS É DEPENDENTE DE FC γ R

Os ensaios seguintes foram usados para determinar se a depleção das células B por um anticorpo anti-CD19 foi dependente da expressão de FC γ R. Através de um processo de reprodução cruzada de hCD19tg com ratinhos sem expressão de certos FC γ R, foram gerados ratinhos que expressam hCD19 e não possuem a expressão de certos FC γ R. Esses ratinhos foram usados em ensaios para avaliar a capacidade de anticorpos anti-CD19 para depleção das células B através de vias que envolvem a expressão de FC γ R, por exemplo, ADCC. Assim, anticorpos anti-CD19 identificados nestes ensaios podem ser usados para modificar anticorpos anti-CD19 quiméricos, humanos ou humanizados usando as técnicas descritas acima na Secção 5.1. Esses anticorpos podem, por sua vez, ser usados nas composições e para uso nos métodos da invenção para o tratamento de malignidades das células B em humanos.

O sistema imune inato medeia a depleção das células B após tratamento com anticorpo anti-CD20 através de processos dependentes de FC γ R. Células efectoras de ratinho expressam quatro diferentes classes de FC γ R para IgG, o FC γ RI de alta afinidade (CD64), e o FC γ RII de baixa afinidade (CD32), FC γ RIII (CD16), e moléculas de FC γ RIV. FC γ RI, FC γ RIII e FC γ RIV são complexos hetero-oligoméricos nos quais as respectivas cadeias α de ligação a ligando se associam com uma cadeia γ comum (Fc γ R γ). A expressão da cadeia Fc γ R γ é necessária para a montagem de FC γ R e para FC γ R desencadear as funções efectoras, incluindo fagocitose por macrófagos. Uma vez que ratinhos Fc γ R γ -/- não possuem FC γ RI de alta

afinidade (CD64) e FcγRIII de baixa afinidade (CD16) e moléculas FcγRIV, os ratinhos FcRγ^{-/-} expressando hCD19 foram usados para avaliar o papel de FcγR na depleção das células B em tecidos após tratamento com anticorpo anti-CD19. **A Fig. 9A** mostra a depleção representativa das células B do sangue e baço sete dias após tratamento com anticorpo anti-CD19 ou controlo de isotipo de animais da mesma ninhada FcRγ^{+/-} ou FcRγ^{-/-}. Os números indicam a percentagem de linfócitos B220⁺ dentro dos limites indicados. **A Fig. 9B** mostra depleção das células B do sangue e tecidos sete dias após tratamento com anticorpo de animais da mesma ninhada FcRγ^{-/-} ao dia zero. Para o sangue, os valores mostrados após o tempo zero representam dados obtidos na hora 1. Os gráficos de barras representam números de células B B220⁺ médios (±SEM) após tratamento com anticorpo anti-CD19 (barras preenchidas) ou controlo de isotipo (barras abertas) de ratinhos (≥ 3 ratinhos por grupo). Diferenças significativas entre resultados médios para ratinhos tratados com anticorpo anti-CD19 ou controlo de isotipo são indicadas; *p<0,05, **p<0,01. Os resultados apresentados nas **Figs. 9A e 9B** demonstram que a depleção das células B após tratamento com anticorpo anti-CD19 é dependente de FcRγ. Não houve alterações significativas nos números de células B da medula óssea, sangue, baço, nódulos linfáticos e cavidade peritoneal em ratinhos FcRγ^{-/-} após tratamento com anticorpo FMC63 quando comparado com animais da mesma ninhada FcRγ^{-/-} tratados com um anticorpo IgG2a de controlo. Pelo contrário, o tratamento com anticorpo anti-CD19 depletou a maioria das células B em animais da mesma ninhada FcRγ^{+/-}. Assim, o tratamento com anticorpo anti-CD19 primariamente depleta as células B do sangue e de tecidos através de vias que requerem a expressão de FcγRI e FcγRIII.

A **Fig. 9C** mostra números representativos de células B em ratinhos hCD19TG-1^{+/-} depletados de monócitos. Os ratinhos foram tratados com lipossomas de clodronato ao dia -2, 1 e 4, e dados mAb FMC63 (n=9), controlo de isotipo (n=6), ou CD20 (n=3) (250 µg) ao dia 0. Os ratinhos tratados com lipossomas de PBS e anticorpo anti-CD19 FMC63 (n=3) serviram de controlos. Depleção representativa das células B do sangue e baço é mostrada 7 dias após tratamento com anticorpo com a percentagem de linfócitos dentro dos limites indicados.

A **Fig. 9D** mostra depleção das células B do sangue e de tecidos 7 dias após tratamento com anticorpo como em (C). Os gráficos de barras representam números de células B B220⁺ médios (\pm SEM) após tratamento com anticorpo de ratinhos (≥ 3 ratinhos por grupo). Para o sangue, os valores indicam números de células B circulantes em ratinhos tratados com PBS com anticorpo anti-CD19 FMC63 (triângulos fechados), ou ratinhos depletados de monócitos tratados com anticorpo de controlo (círculos abertos), anticorpo CD20 (quadrados fechados), ou anticorpo anti-CD19 FMC63 (círculos fechados). Diferenças significativas entre resultados médios para ratinhos tratados com mAb de controlo de isotipo e outros grupos são indicadas; *p<0,05, **p<001.

Os resultados apresentados na **Fig. 9** mostram que a depleção das células B após tratamento com anticorpo anti-CD19 é dependente de FcR γ e de monócitos. Ratinhos tornados deficientes em macrófagos por tratamento com clodronato encapsulado em lipossoma não depletaram significativamente as células B circulantes 1 dia após tratamento com anticorpo FMC63, anti-CD20 (MB20-11) ou anti-CD19 de

controle, enquanto o tratamento com anticorpo FMC63 eliminou as células B circulantes em ratinhos tratados com lipossomas carregados com PBS (**Figs. 9C-D**). Após 4-7 dias, o número de células B em circulação foi significativamente depletado em ambos os tratamentos com anticorpos FMC63 e anti-CD20, com o tratamento com anticorpo anti-CD19 a ter efeitos mais dramáticos nos números de células B em ratinhos tratados com clodronato. De modo semelhante, o tratamento com anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 diminuiu os números de células B220⁺ da medula óssea em 55% em ratinhos tratados com clodronato ao dia 7 em relação aos animais da mesma ninhada tratados com anticorpo de controle, enquanto o tratamento com anticorpo anti-CD19 diminuiu os números de células B220⁺ de medula óssea em 88% em ratinhos tratados com PBS. O tratamento com anticorpo anti-CD19 diminuiu os números de células B do baço em 52% em ratinhos tratados com clodronato ao dia 7 em relação aos animais da mesma ninhada tratados com anticorpo de controle, enquanto o anticorpo anti-CD20 depletou minimamente as células B, e o tratamento com anticorpo anti-CD19 diminuiu os números de células B do baço em 89% em ratinhos tratados com PBS. Ambos os tratamentos com anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 diminuíram os números de células B nos nódulos linfáticos em 48-53% em ratinhos tratados com clodronato ao dia sete em relação aos animais da mesma ninhada tratados com anticorpo de controle, enquanto o tratamento com anticorpo anti-CD19 diminuiu os números de células B nos nódulos linfáticos em 93% em ratinhos tratados com PBS. O tratamento com anticorpo anti-CD19 no sangue, baço e nódulos linfáticos, foi significativamente menos eficaz em ratinhos tratados com clodronato do que nos animais da mesma ninhada tratados com PBS ($p < 0,01$). Estes achados implicam os macrófagos como as principais células efetoras para depleção de células B CD19⁺ e CD20⁺ *in vivo*, e indicam que o tratamento com anticorpo anti-CD19 pode ser mais

eficaz do que o tratamento com anticorpo anti-CD20 quando os números ou a função dos monócitos são reduzidos.

6.4. EXEMPLO 4: A DEPLEÇÃO DE CÉLULAS B INDUZIDA POR ANTICORPOS ANTI-CD19 É DURÁVEL

De modo a avaliar a eficácia e duração da depleção das células B, uma única dose baixa de 250 µg de injeção de anticorpo anti-CD19 foi administrada a ratinhos hCD19TG. As **Figs. 10A-10C** demonstram a duração e resposta à dose da depleção das células B após tratamento com anticorpos anti-CD19. A **Fig. 10A** mostra os números de células B B220⁺ do sangue e células T Thy-1⁺ após tratamento com anticorpo FMC63 ou controlo de isotipo de ratinhos TG-1^{+/-} ao dia zero. Os valores representam resultados médios (±SEM) de seis ratinhos em cada grupo. Os resultados demonstram que as células B circulantes foram depletadas durante 13 semanas com uma recuperação gradual das células B do sangue ao longo das 13 semanas seguintes. A representação de células T Thy-1⁺ não foi alterada como resultado do tratamento anti-CD19.

As **Figs. 10B-10C** mostram depleção representativa das células B de tecidos nos ratinhos mostrados na **Fig. 10A** às 11, 16, e 30 semanas após tratamento com anticorpo. Os números indicam a percentagem de linfócitos B220⁺ dentro dos limites indicados. Os resultados na **Fig. 10B** mostram que a medula óssea, sangue, baço, nódulos linfáticos, e cavidade peritoneal foram essencialmente destituídos de células B 11 semanas após o tratamento com anticorpos (diferenças significativas entre médias das amostras são indicadas; *p<0,05, **p<0,01). Após o primeiro aparecimento de células B circulantes, levou >10 semanas adicionais para o número de células B em circulação atingir a gama normal.

À semana 16 após tratamento com anticorpo, os números de células B no sangue, baço, LN e PL começaram a recuperar enquanto as células B do compartimento BM não foram significativamente diferentes dos controles não tratados. Como mostrado na **Fig. 10C** à semana 30, todos os tecidos foram repopulados com células B a níveis comparáveis com os dos controles normais.

A **Fig. 10D** mostra as resposta às doses de anticorpos anti-CD19 para depleção das células B do sangue, medula óssea e baço. Os ratinhos foram tratados com anticorpos anti-CD19 no dia zero com a representação das células B dos tecidos avaliada ao dia sete. Os resultados representam aqueles obtidos com três ratinhos em cada grupo para cada dose de anticorpo. As doses de anticorpo controle foram 250 µg. Diferenças significativas entre médias das amostras são indicadas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Uma dose única de anticorpo FMC63 tão baixa como 2 µg/ratinho depletou significativamente o número de células B em circulação, enquanto 10 µg do anticorpo HB12b foram necessários para reduzir significativamente o número de células B em circulação (**Fig. 10D**). Depleção significativa das células B da medula óssea e baço ao dia sete precisaram de doses de anticorpo 5 vezes mais altas que 10-50 µg/ratinho. Assim, o tratamento com anticorpo CD19 a doses relativamente baixas pode depletar a maioria das células B circulantes e em tecidos durante períodos de tempo significativos.

6.5.1. CD19 PERSISTE NA SUPERFÍCIE DAS CÉLULAS B APÓS ADMINISTRAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-CD19

Avaliou-se a internalização de CD19 *in vivo* influenciou a depleção de células B comparando a expressão de CD 19 na

superfície celular a seguir ao tratamento com anticorpo HB12a, HB12b e FMC63 (250 µg).

As **Figs. 11A-11C** mostram expressão de CD19 à superfície das células e a eliminação das células B em ratinhos TG-1^{+/+} tratados com anticorpo HB12a (**Fig. 11A**), HB12b (**Fig. 11B**), FMC63 (**Fig. 11C**) ou controlo de isotipo correspondente (250 µg) *in vivo*. No momento zero (antes da administração de anti-CD19), e às 1, 4, e 24 horas após administração do anticorpo, as células B do baço foram recolhidas e avaliadas quanto à ligação do anticorpo CD19 (linha grossa) e ao controlo (linha fina) tratando as células com anticorpo secundário específico para isotipo *in vitro* com análise de citometria de fluxo. Células B isoladas foram também tratadas *in vitro* com concentrações saturantes de cada anticorpo CD19 mais anticorpo secundário específico de isotipo *in vitro* com análise de citometria de fluxo para visualizar a expressão de CD19 total à superfície da célula. Cada ponto de tempo representa resultados com um ratinho. Os resultados apresentados nas **Figs. 11A-11C** demonstram que CD 19 à superfície da célula não é eliminado da superfície da célula após ligação do anticorpo *in vivo* e mostram que a maioria das células B do baço expressaram níveis altos uniformes de hCD19 à superfície da célula até 24 horas após tratamento com anticorpo embora um subconjunto de células B tenha expressado níveis reduzidos de hCD19 1 hora após tratamento com anticorpo FMC63 (**Fig. 11C**). Os resultados mostrados nas **Figs. 11A-11C** também demonstram que a quantidade de CD19 à superfície das células B é constante, indicando que a capacidade das células B mediarem ADCC é mantida.

Os resultados demonstram que CD19 surpreendentemente exibiram níveis mais baixos de internalização do que

esperado após administração de anticorpos anti-CD19. Em particular, os resultados demonstram que CD 19 inesperadamente persiste na superfície celular após ligação a um anticorpo anti-CD19, pelo que, as células B permanecem acessíveis para atividade ADCC. Estes resultados demonstram, em parte, porque é que os anticorpos anti-CD19 e os regimes de tratamento da invenção são eficazes no tratamento de malignidades das células B.

As **Figs. 12A-12C** documentam a extensão da depleção das células B e a capacidade dos anticorpos anti-hCD19 se ligaram a hCD19 e inibirem assim a ligação a outros anticorpos anti-hCD19. Os resultados na **Fig. 12A** demonstram que uma administração única de FMC63 (250 µg) a ratinhos TG-1^{+/-} resulta na depleção significativa das células B do sangue e baço dentro de 1 hora da administração do anticorpo. Nesta experiência, as células do sangue e baço foram recolhidas e avaliadas quanto às frequências das células B antes da administração do anticorpo anti-CD19 ou em vários momentos subsequentes (1, 4, ou 24 horas). Amostras de sangue foram coradas com anti-Thy1.2 e anti-B220 para identificar células B no quadrante direito inferior. As células de baço foram coradas com anticorpos anti-IgM e anti-B220 para identificar células B dentro dos limites indicados. Cada ponto de tempo representa resultados com um ratinho. Inesperadamente, as células B do sangue foram eliminadas mais rapidamente do que células B esplénicas.

A depleção das células B descrita na **Fig. 12A** sugere que o anticorpo administrado rapidamente saturou os sítios de ligação a anticorpo disponíveis em hCD19 dentro de uma hora de administração. Para confirmar esta observação, ratinhos foram tratados com FMC63 (anticorpo de ligação a hCD 19) ou

anticorpo de controlo de isotipo. Em vários momentos subsequentes as células B do sangue e baço foram coradas com o anticorpo B4 conjugado a fluorocromo para identificar sítios de ligação a anticorpo desocupados à superfície das células B mCD19+ ou mCD20+. As frequências das células dentro dos quadrantes superiores e inferiores direitos são indicadas. Cada ponto de tempo representa resultados obtidos para um ratinho. Os resultados indicam que o tratamento com FMC63 resultou numa depleção progressiva de células portadoras de hCD 19 ao longo do curso da experiência com células B do sangue a serem depletadas mais rapidamente do que do baço. As células B remanescentes a cada ponto de tempo puderam ser identificadas pela sua expressão de mCD 19 ou mCD20, mas não foram coradas por B4 sugerindo que o FMC63 administrado estava ligado às restantes células B. Estes achados confirmam a capacidade de FMC63 de se ligar e depletar células B *in vivo*. Além disso, FMC63 previne a ligação a B4 sugerindo que estes anticorpos reconhecem epitopos sobrepostos em hCD19. Os resultados na **Fig. 12C** confirmam que o tratamento com anticorpo HB12b (250 µg) também satura sítios de ligação a anticorpo em hCD 19 dentro de 1 hora de administração e resulta na depleção de células B positivas a hCD19. Inesperadamente, o anticorpo HB12b não inibiu completamente a ligação do anticorpo B4 sugerindo que ao contrário de FMC63, HB12b reconhece um epitopo em hCD19 que é distinto do reconhecido por B4. Os resultados mostrados nas **Figs. 12B-12C** demonstram que a maior parte dos anticorpos anti-CD19 inibem a ligação a outros anticorpos anti-CD19, indicando que a maior parte dos anticorpos anti-CD19 se liga a regiões semelhantes, às mesmas, ou sobrepostas ou epitopos na proteína CD19. Alternativamente, estas observações podem também resultar do tamanho relativamente

pequeno do domínio CD 19 extracelular comparado com o tamanho das moléculas de anticorpo.

6.6. EXEMPLO 5: TRATAMENTO COM ANTICORPO ANTI-CD19 ANULA A IMUNIDADE HUMORAL E AUTOIMNIDADE

Os ensaios descritos neste exemplo podem ser usados para determinar se um anticorpo anti-CD19 é capaz de eliminar ou atenuar respostas imunes. Anticorpos anti-CD19 identificados nestes ensaios podem ser usados para modificar anticorpos anti-CD19 quiméricos, humanos ou humanizados usando as técnicas descritas acima na Secção 5.1. Esses anticorpos podem por sua vez ser usados nas composições e para uso nos métodos da invenção para o tratamento de malignidades das células B em humanos.

O efeito da depleção das células B induzido por anticorpo anti-CD19 nos níveis séricos de anticorpos foi avaliado dando uma única injeção a ratinhos hCD19TG+/- do anticorpo anti-CD19. A **Fig. 13A** mostra que o tratamento com anticorpo CD 19 reduz os níveis séricos de imunoglobulina em ratinhos TG-1^{+/-}. Animais da mesma ninhada com dois meses de idade foram tratados com uma única injeção de anticorpo FMC63 (círculos fechados) ou controlo (círculos abertos) (250 µg) ao dia 0. Os níveis de anticorpo foram determinados por ELISA, com valores médios (±SEM) mostrados para cada grupo de ≥ 5 ratinhos. Diferenças entre ratinhos tratados com CD19 ou de controlo com mAb foram significativas; *p<0,05, **p<0,01. Os resultados mostram que após 1 até 2 semanas, os níveis séricos de anticorpo IgM, IgG2b, IgG3, e IgA foram significativamente reduzidos, e permaneceram reduzidos durante pelo menos 10 semanas (**Fig. 13A**). Os

níveis séricos de IgG1 e IgG2a foram significativamente abaixo do normal às 6 e 4 semanas após tratamento.

Uma vez que ratinhos hCD19TG+/- produzem autoanticorpos detetáveis após 2 meses de idade (Sato et al., J. Immunol, 157:4371(1996)), autoanticorpos séricos que se ligam a ssADN, dsADN e histonas foram avaliados. A **Fig. 13B** mostra que o tratamento com anticorpo anti-CD19 reduz autoanticorpos anti-dsADN, anti-ssADN e níveis de autoanticorpos anti-histona após tratamento com anticorpo anti-CD19. Os resultados mostram que o tratamento com anticorpos anti-CD19 significativamente reduziu os níveis séricos de auto-anticorpo IgM após 2 semanas e preveniu a produção de autoanticorpos de IgG de isotipo trocado até 10 semanas (**Fig. 13B**). Assim, a depleção das células B substancialmente reduziu as respostas de anticorpos agudas e de longo prazo e atenuou as de troca de classe de respostas imunes normais e patogénicas.

A influência da depleção das células B nas respostas de anticorpo de tipo 1 (TI-1) e tipo 2 (TI-2) independentes das células T foi avaliada imunizando ratinhos hCD 19TG+/- com TNP-LPS ou DNP-Ficoll (ao dia zero), 7 dias após tratamento com anticorpo anti-CD19 (FMC63) ou anticorpo de controlo. Respostas de anticorpo significativas de IgM, IgG, e IgA específicas de hapteno não foram observadas em ratinhos tratados com anticorpo anti-CD19 imunizados com qualquer dos antigénios (**Figs. 14A e 14B**). Respostas de anticorpo ao Ag dependente de células T (TD), DNP-KLH, foram também avaliadas usando ratinhos tratados com anticorpo anti-CD19 7 dias antes da imunização (**Fig. 14B**). A **Fig. 14C** mostra que ratinhos imunizados DNP-KLH tratados com anticorpo anti-CD19 mostraram imunidade humoral reduzida. Animais da mesma ninhada foram tratados com

anticorpo FMC63 (círculos fechados) ou de controlo (círculos abertos) (250 µg) sete dias antes das imunizações primárias ao dia zero, com soro obtido ao dia indicado. Para imunizações DNP-KLH, todos os ratinhos foram desafiados com 100 µg de DNP-KLH ao dia 21. Todos os valores são médias (\pm SEM) de unidades OD ELISA obtidos usando soros de cinco ratinhos de cada grupo. Diferenças entre ratinhos tratados com anticorpo anti-CD19 ou de controlo foram significativas; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Os resultados mostram que os animais da mesma ninhada tratados com anticorpo de controlo geraram respostas de anticorpo IgM primárias 7 dias após imunização de DNP-KLH e respostas secundárias após desafio com antígeno ao dia 21 (**Fig. 14C**). No entanto, respostas significativas de anticorpo IgM, IgG ou IgA específicas de hapteno não foram detetadas em ratinhos tratados com mAb CD 19 imunizados ou re-desafiados com antígeno. Para avaliar o efeito da depleção das células B nas respostas de anticorpo secundárias, os ratinhos foram também imunizados com DNP-KLH e tratados com anticorpo anti-CD19 14 dias depois (setas) (**Fig. 14D**). Ao dia 21, respostas de anticorpos anti-DNP IgM, IgG, e IgA séricas tinham diminuído em ratinhos tratados com mAb CD 19 até níveis abaixo dos ratinhos imunizados tratados com mAb de controlo. No entanto, re-desafio de ratinhos tratados com mAb de controlo com DNP-KLH ao dia 21 induziu respostas de anticorpo secundárias significativas, enquanto ratinhos tratados com mAb CD 19 não produziram anticorpos anti-DNP depois de re-desafio com DNP-KLH. Assim, a depleção das células B induzida por mAb CD19 reduziu substancialmente as respostas de anticorpo primárias e secundárias e preveniu a troca de classe durante respostas imunes humorais.

6.7. EXEMPLO 6: TRATAMENTO COM ANTICORPO ANTI-CD19 EM CONJUNTO COM TRATAMENTO COM ANTICORPO ANTI-CD20

O ensaio aqui descrito pode ser usado para determinar se outra combinação ou terapias conjugadas, por exemplo, anticorpos anti-CD19 em combinação com quimioterapia, terapia de toxina ou radioterapia, têm efeitos benéficos, tal como uma depleção de células B aditiva ou mais do que aditiva. Os resultados das terapias de combinação testadas em modelos animais podem ser correlacionados com humanos por meios bem conhecidos na técnica.

Anticorpos anti-CD20 são eficazes a depletar células B humanas e de ratinho *in vivo*. Portanto, o benefício do tratamento simultâneo com anticorpos anti-CD19 (FMC63) e anti-CD20 (MB20-11) foi avaliado para determinar se isto melhora a depleção de células B. Ratinhos foram tratados com doses subótimas de 2 µg de cada anticorpo individualmente, ou uma combinação de ambos os anticorpos a 1 µg, ou com doses de 2 µg combinadas. A **Fig. 15** mostra os resultados de ratinhos TG-1^{+/-} tratados com anticorpos de controlo (250 µg), FMC63 (CD19, 2 µg), MB20-11 (CD20, 2 µg), FMC63+MB20-11 (1 µg cada), ou FMC63+MB20-11 (2 µg cada) ao dia zero. Os números de células B do sangue foram medidos ao momento zero, uma hora, e aos dias um, quatro e sete. Os números de células B de tecidos foram determinados ao dia sete. Os valores representam médias (±SEM) de grupos de três ratinhos. Os resultados mostrados na **Fig. 15** demonstram que tratamentos simultâneos de anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 são benéficos. A depleção das células B em ratinhos tratados com uma combinação de ambos os anticorpos a 1 µg foi intermédia ou semelhante à depleção observada a seguir ao tratamento dos ratinhos com 2 µg de cada anticorpo individual (**Fig. 15**). No entanto, o tratamento

simultâneo de ratinhos com ambos os anticorpos a 2 µg conduziu a significativamente mais depleção das células B do que foi observado com cada anticorpo separadamente. Assim, as terapias de anticorpo anti-CD19 e anti-CD20 combinadas tiveram efeitos benéficos que melhoraram a depleção das células B. Isto resulta provavelmente da acumulação de mais moléculas de anticorpo terapeuticamente eficaz à superfície de células B individuais.

6.8. EXEMPLO 7: ADMINISTRAÇÃO SUBCUTÂNEA (S.C.) DE ANTICORPO ANTI-CD19 É TERAPEUTICAMENTE EFICAZ

O ensaio aqui descrito pode ser usado para determinar se uma via subcutânea de administração de um anticorpo anti-CD19 pode eficazmente depletar as células B. Os resultados da eficácia das diferentes vias de administração testadas em modelos animais podem ser correlacionadas com humanos por meios bem conhecidos na técnica.

Uma vez que o anticorpo anti-CD19 dado i.v. eficazmente depleta células B circulantes e de tecido, foi avaliado se o anticorpo anti-CD19 dado por via s.c. ou i.p. depletou as células B numa extensão equivalente. Ratinhos de tipo selvagem foram tratados com o anticorpo FMC63 a 250 µg por via subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) ou i.v. Os valores representam médias (\pm SEM) dos números de células B B220⁺ do sangue (per mL), medula óssea, baço, nódulo linfático, e cavidade peritoneal ao dia sete (n \geq 3) como avaliado por citometria de fluxo. Diferenças significativas entre resultados médios para cada grupo de ratinhos são indicadas; *p<0,05, **p<0,01 em comparação com o controlo. Os resultados na Fig. 16 demonstram que a administração subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) e i.v. do anticorpo CD 19 depleta eficazmente células B circulantes e de tecido *in vivo*. A grande maioria das células B circulantes e de tecido foi depletada em ratinhos a que

foram dados anticorpos anti-CD19 em doses de 250 µg por i.v., i.p., ou s.c. (Fig. 16). Inesperadamente, dar o anticorpo anti-CD19 i.p. não depletou as células B peritoneais significativamente melhor do que o tratamento i.v. Do mesmo modo, um anticorpo anti-CD19 pode ser usado para depletar eficazmente as células B circulantes e de tecido quando dados como injeções ≤ 64 mg s.c. Uma vez que anticorpos anti-CD19 são eficazes em doses tão baixas como 10 µg i.v. (Fig. 10D) doses de anticorpo s.c. ainda mais baixas são provavelmente eficazes.

6.9. EXEMPLO 8: TRATAMENTO COM ANTICORPO ANTI-CD19 ANULA O CRESCIMENTO TUMORAL *IN VIVO*

Linfoma de Burkitt, uma malignidade das células B em humanos, é caracterizado por translocações do proto-oncogene *c-myc* para regiões promotoras do gene Ig, conduzindo a sobre-expressão aberrante de c-Myc. Do mesmo modo, ratinhos transgênicos Eµ-cMyc (cMycTG), nos quais o proto-oncogene *c-myc* está sob controlo do potenciador da cadeia pesada de Ig, desenvolvem linfomas derivados de células B agressivos numa idade precoce, têm cerca de 90% de taxa de mortalidade às 20 semanas de idade, e têm uma idade mediana de sobrevivência de cerca de 12 semanas (Harris et al., J. Exp. Med. 167:353 (1988) e Adams et al., Nature 318:533(1985)). Tumores de ratinhos c-MycTG não estão restringidos ao estágio de desenvolvimento de células B específicos, mas predominantemente presentes com rearranjos do gene Ig e fenótipos característicos das células pré-B ou B imaturas (Adams et al., Nature 318:533(1985)). Para avaliar a eficácia da imunoterapia dirigida a CD19 *in vivo*, ratinhos hCD19 TG-1^{+/+} e cMycTG foram cruzados para gerar ratinhos hCD19 TG-1^{+/-} cMycTG^{+/-} que desenvolveram linfomas derivados de células B

agressivos numa idade precoce. Células tumorais derivadas de um ratinho foram isoladas, expandidas *in vitro*, e caracterizadas fenotipicamente para serem hCD19⁺ e linfoblastos CD19⁺ CD20⁻ CD43⁻ IgM⁺ IgD⁻ B220⁺ de ratinho, que são típicos das células tumorais pré-B/ B imaturas que se desenvolvem em ratinhos c-mycTG^{+/-} (Harris et al., J. Exp. Med. 167:353 (1988) e Adams et al., Nature 318:533 (1985)). Células tumorais (10⁵) de ratinhos hCD19 TG-1^{+/-} c-mycTG⁺ foram transplantadas i.v. para 20 ratinhos Rag^{-/-} ao dia 0. Números iguais de ratinhos selecionados aleatoriamente foram tratados com anticorpo FMC63 (círculos preenchidos) ou de controlo (círculos abertos) (250 µg) aos dias 1 e 7. A Fig. 17A mostra os números de células tumorais circulantes (±SEM) quantificadas por citometria de fluxo ao longo de um período de 6 semanas e a Fig. 17B mostra a percentagem de sobrevivência dos ratinhos ao longo de um período de 7 semanas. Cada valor indica a percentagem de ratinhos viáveis em cada dia que foram examinados. Os resultados na Fig. 17 demonstram que o tratamento com anticorpo anti-CD19 previne o crescimento do linfoma hCD19⁺ *in vivo*. Transplante destas células tumorais para vinte ratinhos Rag^{-/-} resultou no aparecimento de linfoblastos CD19⁺ e B220⁺ de ratinhos circulantes por 2 semanas em dez recetores selecionados aleatoriamente que foram tratados com um mAb de controlo, com morte às 3,5 semanas. Pelo contrário, tratar dez ratinhos com anticorpo anti-CD19 (dia 1 e 7) após transplante tumoral preveniu o aparecimento de células tumorais circulantes em todos os 10 recetores durante até 7 semanas. Um ratinho tratado com anticorpo anti-CD19 morreu durante a colheita de sangue, mas nunca apresentou células tumorais circulantes. Assim, o tratamento com anticorpo anti-CD19 pode oferecer uma terapia eficaz para tratar pacientes com malignidades da linhagem das células B, especialmente aqueles com tumores que não expressam CD20 ou expressam CD20 a níveis baixos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> MedImmune, Inc.

<120> ANTICORPOS ANTI-CD19 E USOS EM ONCOLOGIA

<130> 11605-005-228

<140>

< 141>

<150> 60/653, 587

< 151> 2005-02-15

<150> 60/702,063

< 151> 2005-07-22

<160> 21

<170> FastSEQ para Windows Versão 4,0

<210> 1

< 211> 373

< 212> DNA

< 213> Murino

<220>

< 223> sequência juncional VH-D-JH de cadeia pesada de anticorpo HB12a anti-(humano)CD19 de ratinho.

<400>1

```
gaattcgagg tgcagctgca ggagtctgga cctgagctgg taaagcctgg ggcttcagtg 60
aagatgtcct gcaaggcttc tggatacaca ttcactagct atgttatgca ctgggtgaag 120
cagaagcctg ggcagggcct tgagtggatt ggatatttta atccttaca tgatggtaact 180
gattactatg agaagttcaa aggcaaggcc aactgactt cagacaaatc ctccagcaca 240
gcctacatgg cgctcagcag cctgacctct gaggactctg cgggtctatta ctgtgcaaga 300
gggacctatt actacggtag tagctacccc ttgactact ggggccaaagg caccactctc 360
acagtctcct cag                                     373
```

<210> 2

< 211> 124

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> sequência juncional VH-D-JH de cadeia pesada de anticorpo HB12a anti-(humano)CD19 de ratinho.

<400> 2

```

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

```

```

      85      90      95
Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Pro Phe Asp
 100      105      110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115      120

```

<210> 3

< 211> 370

< 212> DNA

< 213> Murino

<220>

< 223> sequência juncional VH-D-JH de cadeia pesada de anticorpo HB12b anti-(humano)CD19 de ratinho.

<400> 3

```

gaattcgagg tgcagctgca ggagtctgga cctgagctgg tgaagcctgg ggcctcagtg 60
aagatttcct gcaaagcttc tggctacgca ttcagtagct cttggatgaa ctgggtgata 120
cagaggcctg gacagggctc tgagtggatt ggacggattt atcctggaga tggagatact 180
aactacaatg ggaagttcaa gggcaaggcc aactgactg cagacaaatc ctccagtaca 240
gcctacatgc agctcagcag octgacctct gtggactctg cggctctatt ctgtgcaga 300
tcaggattta ttactacggt tttagacttt gactactggg gccacggcac cactctcaca 360
gtctcctcag                                     370

```

<210> 4

< 211> 123

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> sequência juncional VH-D-JH de cadeia pesada de anticorpo HB12b anti-(humano)CD19 de ratinho.

<400> 4,

```

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

```

<210> 5

< 211> 124

< 212> PRT

< 213> Sequência Artificial

<220>

< 223> Sequência de consenso de VH-D-JH de junção de cadeia pesada do anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400> 5

```

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

```

<210> 6

< 211> 121

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

<223> junção VH-D-JH de cadeia pesada 4G7 de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400> 6

```

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

```

<210> 7

< 211> 124

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

<223> junção VH-D-JH de cadeia pesada HD37 de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400>7

```

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 Ser Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 8

< 211> 124

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> junção VH-D-JH de cadeia pesada B43 de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400> 8


```

Gln Val Gln Leu Leu Glu 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 Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Ser 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> 9
 < 211> 121
 < 212> PRT
 < 213> Murino

<220>
 < 223> junção VH-D-JH de cadeia pesada FMC63 de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

```

<400> 9
Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1      5      10      15
Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr
20      25      30
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35      40      45
Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Asp Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu
50      55      60
Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
65      70      75      80
Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85      90      95
Ala Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100     105     110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115     120

```

<210> 10
 < 211> 114
 < 212> PRT
 < 213> Sequência Artificial

<220>
 < 223> sequência consenso de cadeia leve V-kapa de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400> 10

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr 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 Asn
      20           25           30
Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
      35           40           45
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro Asp
      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 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr
      85           90           95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100          105          110
Ala Asp

```

<210> 11

< 211> 112

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> cadeia leve V-kapa HD37 de anticorpo CD19 anti-
(humano) de ratinho

<400> 11

```

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr 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 Arg
      100          105          110

```

<210> 12

< 211> 114

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223 > cadeia leve V-kapa B43 de anticorpo CD19 anti-
(humano) de ratinho

<400> 12

```

Glu Leu Val 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 Arg
          100          105          110
Arg Ser

```

<210> 13

< 211> 107

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> cadeia leve V-kapa FMC63 de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400> 13

```

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

```

<210> 14

< 211> 115

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> cadeia leve V-kapa 4G7 de anticorpo CD19 anti-(humano) de ratinho

<400> 14

```

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

```

<210> 15

< 211> 494

< 212> DNA

< 213> Murino

<220>

< 221> CDS

< 222> (57)...(494)

< 223> cadeia leve HB12a de anticorpo CD19 anti-
(humano) de ratinho

<400> 15

```

catggactga aggagtagaa aactgatcac tctcctatgt ttatttcctc aaaatg atg 59
Met
1

agt cct gcc cag ttc ctg ttt ctg tta gtg ctc tgg att cag gaa acc 107
Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln Glu Thr
5      10      15

aac ggt gat gtt ggg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtc acc 155
Asn Gly Asp Val Gly Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr
20      25      30

att gga caa cca gcc tct ttc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta 203
Ile Gly Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
35      40      45

tat agt aat gga aaa acc tat ttg aat tgg tta tta cag agg cca ggc 251
Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly
50      55      60      65

cag tct cca aag cgc cta atc cat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga 299
Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly

```

	70	75	80	
gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca gga aca gat ttt aca ctg				347
Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu				
	85	90	95	
aaa atc ggc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tac tgc gtg				395
Lys Ile Gly Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val				
	100	105	110	
caa ggt aca cat ttt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aaa cta gaa				443
Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu				
	115	120	125	
ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc				491
Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser				
	130	135	140	145
agt				494
Ser				

<210> 16
 < 211> 146
 < 212> PRT
 < 213> Murino

<220>
 < 223> cadeia leve HB12a de anticorpo CD19 anti-
 (humano) de ratinho prevista

<400> 16
Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Gln Glu
1 5 10 15
Thr Asn Gly Asp Val Gly Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
20 25 30
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45
Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
50 55 60
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Ile Gly Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110
Val Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Ser
145

<210> 17
 < 211> 485
 < 212> DNA
 < 213> Murino

<220>
 < 221> CDS
 < 222> (48)...(485)
 < 223> cadeia leve HB12b de anticorpo CD19 anti-
 (humano) de ratinho

<400> 17

```

catggactga aggagtagaa aagcattctc tcttcagtt ctacagag atg gag aaa 56
                                     Met Glu Lys
                                     1

gac aca ctc ctg cta tgg gtc ctg ctt ctc tgg gtt cca ggt tcc aca 104
Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr
   5              10              15

ggt gac att gtg ctg acg cag tct cca acc tct ttg gct gtg tct cta 152
Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu
  20              25              30              35

ggg cag agg gcc acc atc tcc tgc aga gcc agc gaa agt gtt gat act 200
Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr
              40              45              50

ttt ggc att agt ttt atg aac tgg ttc caa cag aaa cca gga cag cca 248
Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
              55              60              65

ccc aaa ctc ctc atc cat gct gca tcc aat caa gga tcc ggg gtc cct 296
Pro Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro
              70              75              80

gcc agg ttt agt ggt agt ggg tct ggg acg gac ttc agc ctc aac atc 344
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile
   85              90              95

cat cct atg gag gag gat gat agt gca atg tat ttc tgt cag caa agt 392
His Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser
  100              105              110              115

aag gag gtt cca ttc acg ttc ggc tgc ggg aca aag ttg gaa ata aaa 440
Lys Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              120              125              130

cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt 485
Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
              135              140              145

```

<210> 18

< 211> 146

< 212> PRT

< 213> Murino

<220>

< 223> cadeia leve HB12b de anticorpo CD19 anti-
(humano) de ratinho

<400> 18

```

Met Glu Lys Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
  1              5              10              15
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala
  20              25              30
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
  35              40              45

```

```

Val Asp Thr Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro
  50          55          60
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
  65          70          75          80
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser
          85          90          95
Leu Asn Ile His Pro Met Glu Glu Asp Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
          100          105          110
Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
          115          120          125
Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
          130          135          140
Ser Ser
145

```

```

<210> 19
< 211> 31
< 212> DNA
< 213> Sequência Artificial

```

```

<220>
< 223> primer 5' VH de sentido promiscuo (MsVHE)

```

```

<400> 19
gggaattcga ggtgcagctg caggagtctg g      31

```

```

<210> 20
< 211> 31
< 212> DNA
< 213> Sequência Artificial

```

```

<220>
< 223> primer antissentido complementar à região
codificando C (primer C 1)

```

```

<400> 20
gagttccagg tcaactgtcac tggctcaggg a      31

```

```

<210> 21
< 211> 27
< 212> DNA
< 213> Sequência Artificial

```

```

<220>
< 223> primer 3' antissentido específico da região
constante

```

```

<400> 21
gactgaggca cctccagatg ttaactg      27

```

Lisboa, 20 de outubro de 2015

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo anti CD 19 monoclonal quimerizado ou humanizado que (a) é do isotipo humano IgG1 ou IgG3, ou (b) medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humano, num transportador farmaceuticamente aceitável, em que o anticorpo compreende as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 115 da SEQ ID NO:2 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 43 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:16, ou as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 114 da SEQ ID NO:4 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 44 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:18, em que uma substituição de aminoácido é introduzida numa ou mais das referidas sequências e em que o anticorpo é capaz de depletar as células B expressando CD 19 da medula óssea.
2. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3 é inferior a cerca de 1 mg/kg do peso corporal do paciente.
3. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, em que uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-CD19 monoclonal quimerizado do isotipo humano IgG1 ou IgG3

é superior a cerca de 2 mg/kg do peso corporal do paciente.

4. A composição de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo anti-CD 19 que medeia ADCC é do isotipo humano IgG1, ou IgG3.
5. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-CD19 tem uma semivida de pelo menos 4 até 7 dias.
6. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a composição compreende uma dose de 1500 mg/m² ou menos do anticorpo anti-CD 19 e em que o anticorpo anti-CD 19 é administrado por uma via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.
7. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 6, em que a composição compreende uma dose de 375 mg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e em que o anticorpo anti-CD19 é administrado por uma via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.
8. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 7, em que a composição compreende uma dose de 1,5 mg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e em que o anticorpo anti-CD19 é administrado por uma via parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.
9. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 8, em que a composição compreende uma dose de 0,5 µg/m² ou menos do anticorpo anti-CD19 e em que o anticorpo anti-CD19 é administrado por uma via

parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa ou subcutânea.

10. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-CD19 é marcado de forma detetável, é um anticorpo nu, é conjugado a um composto terapêutico, é conjugado a um agente citotóxico, ou é conjugado a um agente de diagnóstico.
11. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-CD19 é biespecífico.
12. A composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo biespecífico anti-CD 19 tem especificidade para se ligar a células efetoras.
13. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a função ADCC do anticorpo anti-CD 19 é avaliada medindo a capacidade do anticorpo anti-CD19 para mediar a lise da célula alvo por células efetoras *in vitro*.
14. A composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo anti-CD19 compreende uma cadeia pesada consistindo numa sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.
15. A composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações precedentes, em que o anticorpo anti-CD 19 compreende a cadeia leve consistindo numa

sequência com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:18.

- 16.** Um anticorpo anti-CD19 monoclonal humanizado que (a) é do isotipo humano IgG1 ou IgG3, ou (b) medeia citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos, em que o anticorpo compreende as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, 51 até 68 e 101 até 115 da SEQ ID NO:2 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 43 até 58, 74 até 80 e 113 até 121 da SEQ ID NO:16, ou as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, 51 até 68 e 101 até 114 da SEQ ID NO:4 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 44 até 58, 74 até 80 e 113 até 121 da SEQ ID NO:18, em que uma substituição de aminoácido é introduzida numa ou mais das referidas sequências, para uso no tratamento de uma malignidade das células B num paciente humano, em que o anticorpo é capaz de depletar as células B expressando CD 19 da medula óssea.
- 17.** O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 16, em que o anticorpo anti-CD19 compreende uma cadeia pesada consistindo numa sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.
- 18.** O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 16 ou 17, em que o anticorpo compreende a cadeia leve consistindo numa sequência com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:18.

19. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, em que o anticorpo é capaz de depletar as células B circulantes.
20. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 até 19, em que a malignidade das células B é leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células do manto, leucemia linfoblástica aguda de células pré B, ou leucemia linfoblástica das células B precursora.
21. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 até 20, em que o anticorpo anti-CD 19 que medeia ADCC é do isotipo humano IgG1 ou IgG3.
22. O anticorpo para uso de acordo com as reivindicações 16 até 20, em que a malignidade das células B é tratada antes da administração do anticorpo anti-CD 19.
23. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 até 20, em que a malignidade das células B é tratada com uma terapia que não uma terapia de anticorpo anti-CD 19 subsequente à administração do anticorpo anti-CD 19.
24. O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 22 ou reivindicação 23, em que o tratamento da malignidade é quimioterapia, radioimunoterapia, terapia de toxina, terapia de enzima ativadora de pró-fármaco, terapia de anticorpo, terapia potenciadora de monócitos ou macrófagos, terapia imunoreguladora, terapia da neovasculatura tumoral com estatina, terapia com caliqueamicina; terapia cirúrgica, ou qualquer combinação destas.

- 25.** Um anticorpo anti CD19 monoclonal que medeia a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) em humanos compreendendo as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 115 da SEQ ID NO:2 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 43 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:16, ou as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 33 até 37, aminoácidos 51 até 68 e aminoácidos 101 até 114 da SEQ ID NO:4 e as sequências conforme estabelecido para os aminoácidos 44 até 58, aminoácidos 74 até 80 e aminoácidos 113 até 121 da SEQ ID NO:18, em que uma substituição de aminoácido é introduzida numa ou mais das referidas sequências e em que o anticorpo é capaz de depletar as células B expressando CD 19 da medula óssea para uso num regime para (a) tratar uma doença em fase precoce resultante de uma malignidade das células B num paciente humano, ou (b) tratar uma malignidade das células B num indivíduo humano em que o indivíduo humano não recebeu tratamento previamente para a malignidade, a malignidade das células B é positiva para CD 19 ou o humano tem uma contagem de monócitos pelo menos 1 por dL, em que o regime de administração depleta as células B em circulação.
- 26.** O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 25, em que o anticorpo compreende uma cadeia pesada consistindo numa sequência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO:2 ou SEQ ID NO:4.
- 27.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 26, em que o anticorpo anti-

CD19 compreende a cadeia leve consistindo numa sequência com pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:18.

28. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 27, em que uma terapia que não uma terapia de anticorpo anti-CD 19 é subsequentemente administrada ao humano.
29. O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 28, em que a terapia é quimioterapia, radioterapia, terapia à base de toxina, terapia de base radioquímica ou terapia cirúrgica.
30. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 29, em que o regime compreende a administração do anticorpo como um único agente terapêutico, em combinação com outro agente terapêutico, ou em combinação com um agente que reduz os efeitos secundários tóxicos.
31. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 30, em que o regime compreende a administração repetida do anticorpo.
32. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 30, em que o anticorpo anti-CD 19 tem uma semivida que é pelo menos 4 até 7 dias.
33. O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 32, em que o anticorpo anti-CD 19 é um anticorpo do isotipo IgG1 ou IgG3 humano.

- 34.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 33, em que o anticorpo anti-CD19 é um anticorpo humanizado.
- 35.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 até 34, em que a malignidade das células B é um linfoma não de Hodgkin subtipo de célula B (NHL) incluindo NHL de baixo grau/folicular, NHL linfocítico pequeno (SL), NHL de grau intermédio/folicular, NHL difuso de grau intermédio, NHL imunoblástico de alto grau, NHL linfoblástico de alto grau, NHL de células não clivadas pequenas de alto grau e NHL de doença volumosa; Linfoma de Burkitt; mieloma múltiplo; leucemia linfoblástica aguda pré-B e outras malignidades que derivam dos precursores de células B iniciais; leucemia linfocítica aguda comum; leucemia linfocítica crónica; leucemia de células pilosas; leucemia linfoblástica aguda de tipo Null; macroglobulinemia de Waldenstrom; e leucemia pró-linfocítica; doença da cadeia leve; plasmocitoma; mieloma osteoclerótico; leucemia de células plasmáticas; gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS); mieloma múltiplo latente (SMM); mieloma múltiplo indolente (IMM); ou linfoma de Hodgkin.
- 36.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 35, em que o regime compreende adicionalmente a administração de um composto que potencia a função de monócitos ou macrófagos.
- 37.** O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 28, em que o humano é imunocomprometido.

- 38.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 até 35, em que o anticorpo anti-CD 19 é administrado por via parentética, intraperitoneal, ou intramuscular.
- 39.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 até 35, em que o anticorpo anti-CD 19 é administrado por uma via intravenosa ou subcutânea.
- 40.** O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 39, em que o anticorpo anti-CD19 é administrado por uma via subcutânea numa dose de $37,5 \text{ mg/m}^2$ ou menos.
- 41.** O anticorpo para uso de acordo com a reivindicação 40, em que o anticorpo anti-CD19 é administrado numa dose de $1,5 \text{ mg/m}^2$ ou menos.
- 42.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 41, em que o regime compreende mais do que uma administração do anticorpo anti-CD19 ao humano.
- 43.** O anticorpo para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 até 42, em que o regime compreende adicionalmente a administração de um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-CD22, um anticorpo anti-CD52, ou qualquer combinação destes.

Lisboa, 20 de outubro de 2015

FIG. 1A

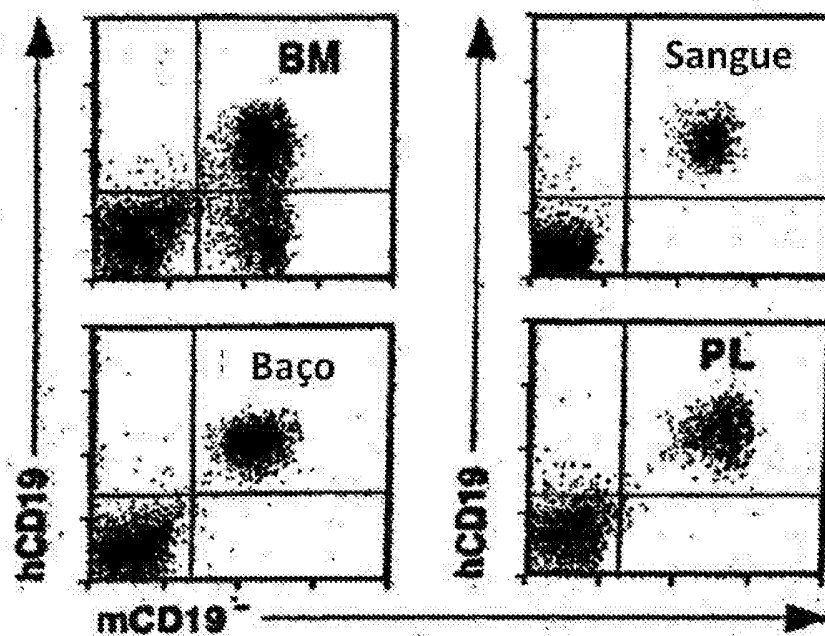


FIG. 1B

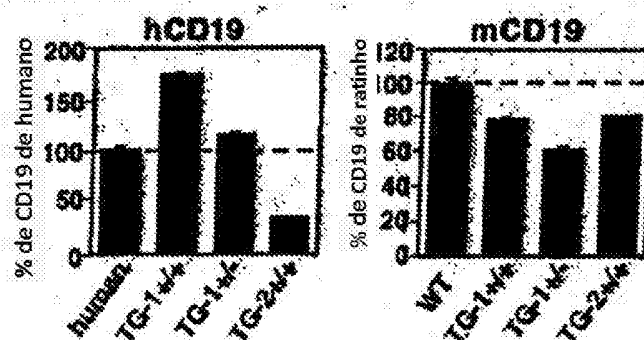


FIG. 1C

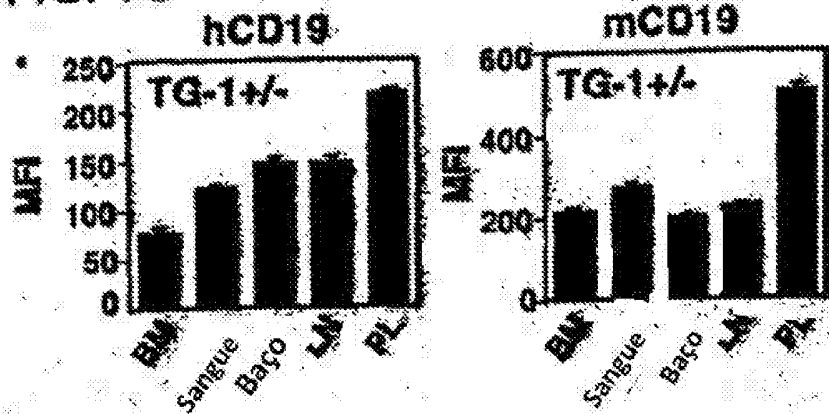


FIG. 1D

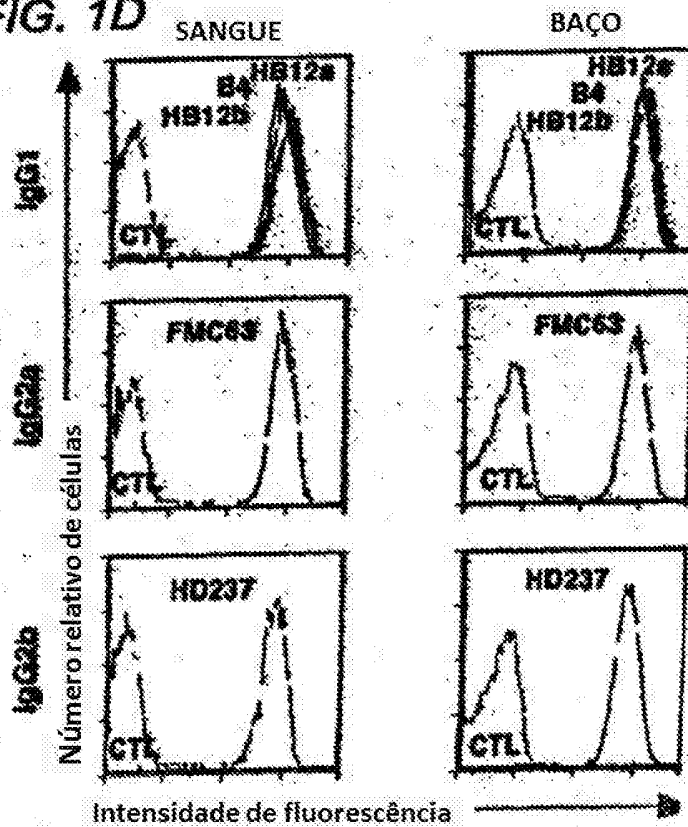


FIG. 1E

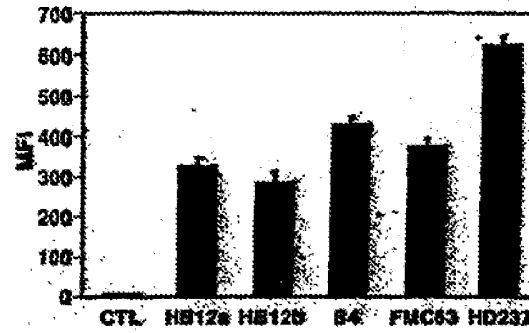


FIG. 2A

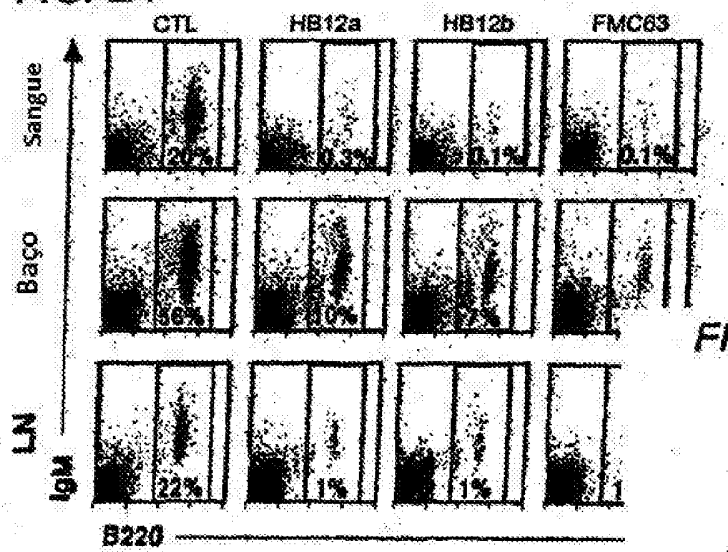


FIG. 2B

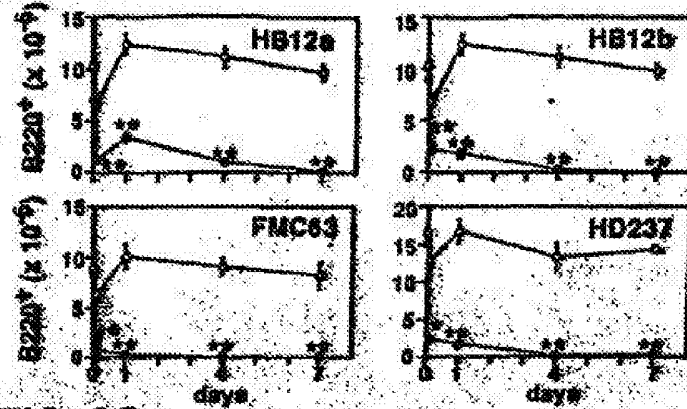


FIG. 2C

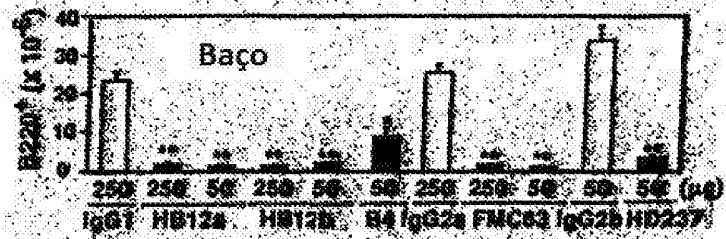
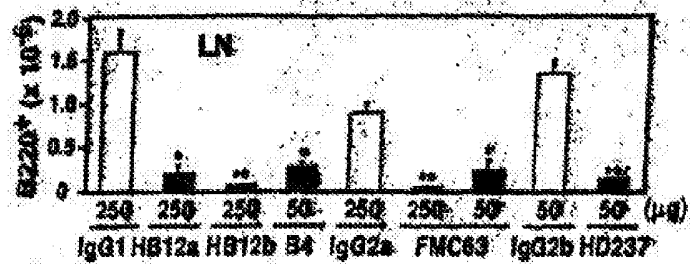


FIG. 2D



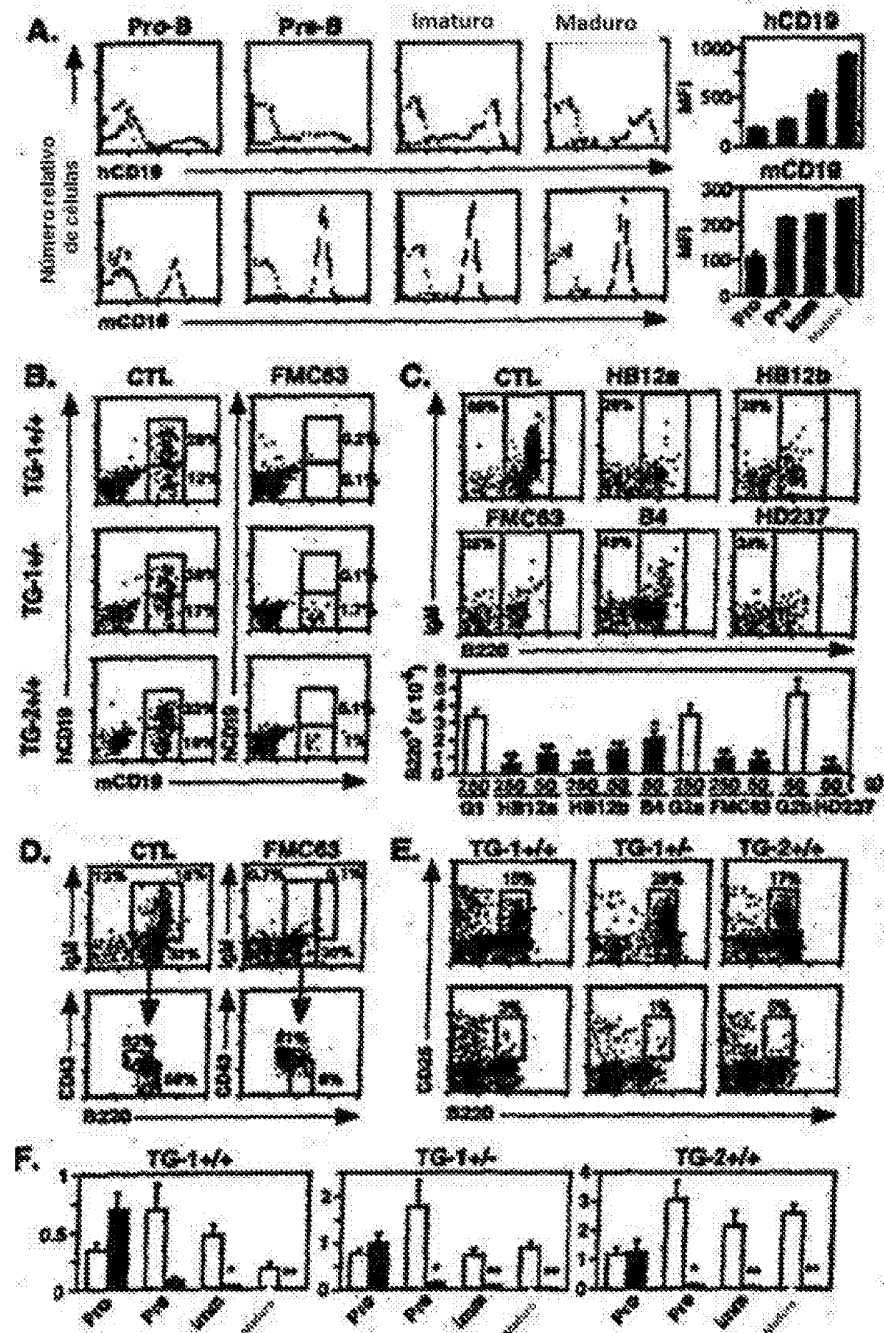


Figura 3

FIG. 4A

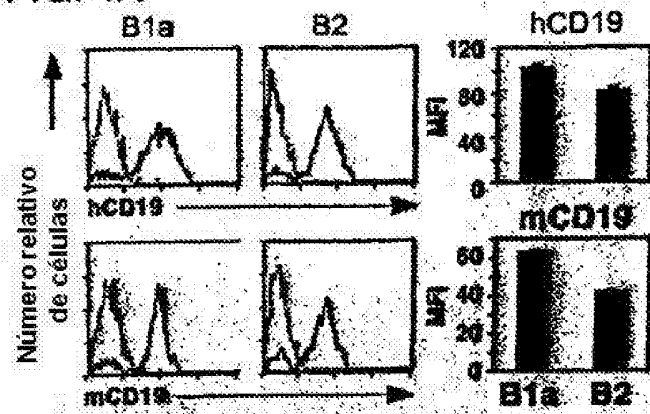


FIG. 4B

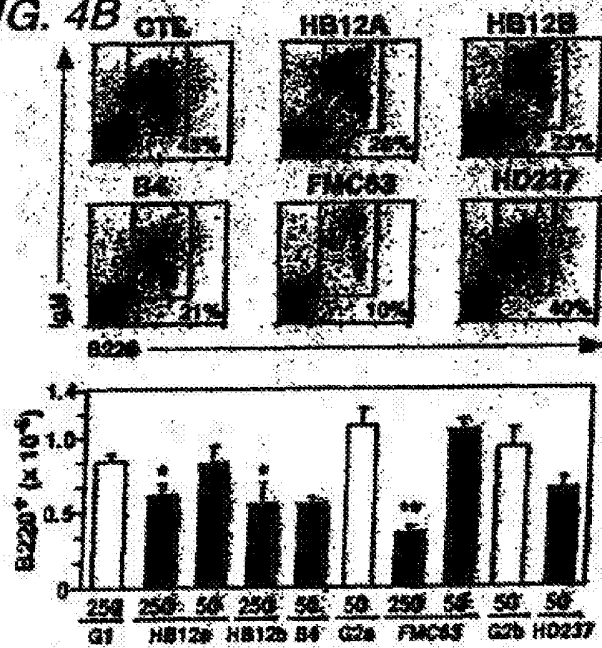


FIG. 4C

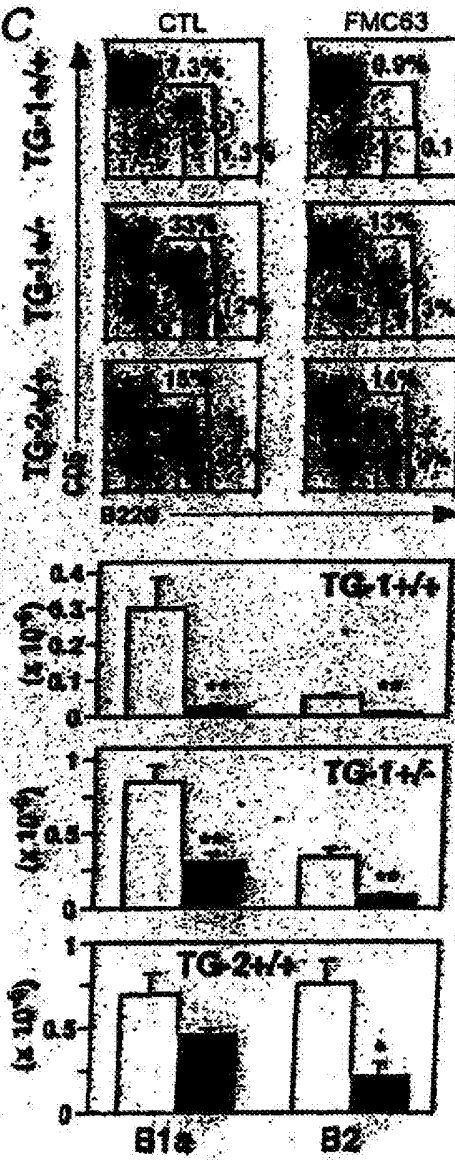


FIG. 5A

HB12a HC

```

      1      10      18
E F E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V
GAA TTC GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTA AAG CCT GGG GCT TCA GTG 60

      21      30      38
K M S C K A S G Y T P T S Y V M H W V K
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACA TTC ACT AGC TAT GTT ATG CAC TGG GTG AAG 120

      41      50      58
Q K P G Q G L E W I G Y P N P Y N D G T
CAG AAG CCT GGG CAG GGC CTT GAG TGG ATT GGA TAT TTT AAT CCT TAC AAT GAT GGT ACT 180

      61      70      78
D Y Y E K F K G K A T L T S D K S S S T
GAT TAC TAT GAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA CTG ACT TCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA 240

      81      90      98
A Y M A L S S L T S E D S A V Y Y C A R
GCC TAC ATG GCG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA 300

      101      110      118
G T Y Y Y G S S Y P F D Y W G Q G T T L
GGG ACC TAT TAC TAC GGT AGT AGC T AC CCC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC 360

      122
T V S S
ACA GTC TCC TCA G 373

```


FIG. 5B

HB12b HC

```

      1      10      18
E F E V Q L Q E S G P E L V K P G A S V
GAA TTC GAG GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA GTG 60

      21      30      38
K I S C K A S G Y A F S S S W M N W V I
AAG ATT TCC TGC AAA GCT TCT GGC TAC GCA TTC AGT AGC TCT TGG ATG AAC TGG GTG ATA 120

      41      50      58
Q R P G Q G L E W I G R I Y P G D G D T
CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA CCG ATT TAT CCT GGA GAT GCA GAT ACT 180

      61      70      78
N Y N G K P K G K A T L T A D K S S S T
AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGT ACA 240

      81      90      98
A Y M Q L S S L T S V D S A V Y F C A R
GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACC TCT GTG GAC TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA 300

      101      110      118
S G F I T T V L D F D Y W G H G T T L T
TCA GGA TTT ATT ACT ACG GTT TTA G AC TTT GAC TAC TGG GGC CAC GGC ACC ACT CTC ACA 360

      121
V S S
GTC TCC TCA G 370

```

HB12a 1C

CATGGACTGAGAGGAGTAGAAAACCTGATCACTCTCTCTATGTTTATTTCTCAGAAATG 56
 N S P A Q F L F L L V L M I Q E T S G 113
 ATG AGT CCT GCC CAG TTC CTG TTT CTG TTA GTG CTC TGG ATT CAG GAA ACC AAC GGT
 1 10 20
 D V G N T Q T F L T L S V T I G Q P A S 173
 GAT GTC GGG ATG ACC CAG ACT CCA CTC ACT TTG TCG GTC ACC ATT GGA CAA CCA GCC TCT
 21 30 40
 F S C K S S Q S L L Y S N G E T Y L N M 233
 TTC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC CTC TTA TAT AGT AAT GGA AAA ACC TAT TTG AAT TGG
 41 50 60
 L L Q R F G Q S P K N L I H L V S E L D 293
 TTA TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CCG CTA ATC CAT CTG GTG TCT AAA CTG GAC
 61 70 80
 S G V P D R F T G S G S G T D Y T L K I 353
 TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGA TCA GGA ACA GAT TTT ACA CTG AAA ATC
 81 90 100
 G R V E A E D L G Y Y Y C V Q S T H F P 413
 GGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAC TGC GTG CAA GGT ACA CAT TTT CCG
 101 110 120
 Y T F G G G T K L E I E R A D A A P T 473
 TAT C AGT TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTA GAA ATA AAA C G G GCT GAT GCT CCA CCA ACT GTA
 121 127
 S I P P P S S
 TCT AGC TTC CTA CTA TTC AGT 494

FIG. 6A

HB12b LC

CATTGACTGAGAGAGTATGAAAGGCAATTCCTCTCCAGTTCCTCAGAG 47
 N E K D T L L L N V L L L W V F G S T G
 ATG GAG AAA GAG ACA CTC CTG CTA TGG GTC CTG CTT CTC TGG GTT CCA GGT TCC ACA GGT 107
 1 10 20
 D I V L T Q S Y T S L A V S L G S R A T
 GAC ATT GTG CTG ACG CAG TCT CCA ACC TCT TTA GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG GCC ACC 167
 21 30 40
 I S C R A S E S V D T P G I S P N N W F
 ATC TCC TGC AGA GCC AGC GAA AGT GTC GAT ACT TTT GGC ATT AGT TTT ATG AAC TGG TTC 227
 41 50 60
 Q Q E P G Q P P E L L I H A A S N Q G S
 CAA CAG AAA CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC CTC ATC CAT GCT GCA TCC AAT CAA GGA TCC 287
 61 70 80
 G V P A R P S G S G S G T D F S L N I N
 GGG GTC CCT GCC AGA TTT AGT GGT AGT GGG TCT GGG ACG GAC TTC AGC CTC AAC ATC CAT 347
 81 90 100
 P M E E D D S A N Y F C Q G S E E V P F
 CTT ATG GAG CAG GAT GAT AGT GCA ATG TAT TTC TGT CAG CAA AGT AAG GAG GTT CCA TT C 407
 101 110 120
 T F S S G T K L E I K N A D A A P T V S
 ACG TTC GGC TCG GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAA CAG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TGG 467
 121 126
 I F P P S S
 ATC TTC CCA CCA TCC AAG 485

FIG. 6B

[illegible]

Conse.	90	100	CDR3	(SEQ ID NO:5)
HB12a	ALSSLTSEDSAVYVCAR	GLTYGYCSWYYPYDNG	CGTLTVSS	124
4G7	122
HB12b	E.....R---V	121
HD37	Q.....V.....F.....	SGFITTVLDF	121
B43	Q.....A.....F.....	RETTIVGR...AN	SV.....	124
FMC63	Q.....R.....S.....	RETTIVGR...AN	V.....	121
	KMN..QTD.T.I.....	K-R.....G---AM	SV.....	120

Sequências de cadeia leve

	1	10	20	CDR1	30	40	50	CDR2	60
Cones.	DI	VTQTPASLAVSLQQRATIS	CKASQSVNY	NGDSTL	AMTQQRPGQPPRLI	YDASNLVSG			
HB12a	VG	LT	S	TI	P	SF	LS	ST	LL
4G7		AAP	IP	TP	ESVS	AS	K	L	NS
843	SL	L	S						
HD37	LL								
HB12b	L	S	T		H	SL	T	F	T
PM63	Q	TS	SA	D	V	A	SL	SL	

	70	80	90	CDR3	100	110	
Cones.	VPORFSGGSGGTDTFTLN	INPVEKEDAA	TYVCCQSTZD	FTT	PGGGTLEIKRAD		(SEQ ID NO:10)
HB12a	T	K	GR	A	LG	V	G
4G7		A	R	SR	A	VGV	M
843	I	P			V		H
HD37	I	P			V		H
HB12b	A	S	M	ED	S	M	F
PM63	S	YS	T	SNL	Q	I	P

FIG. 7B

FIG. 8A

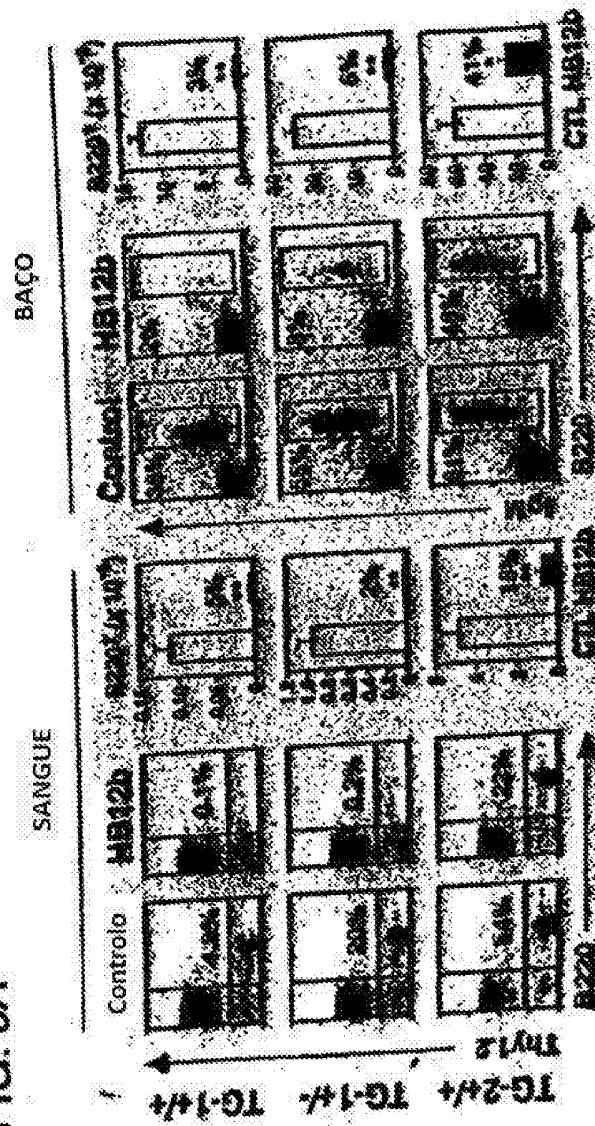
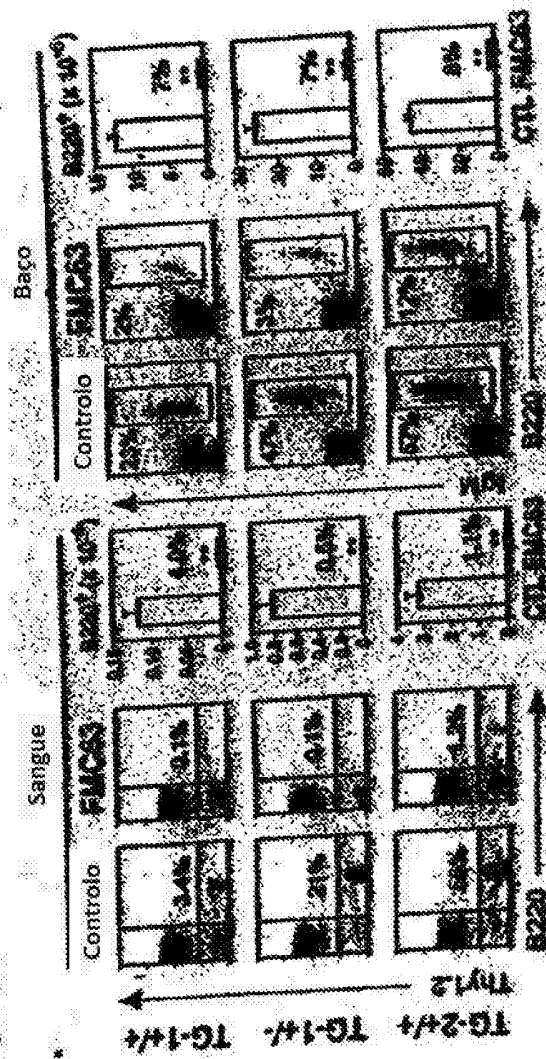


FIG. 8B



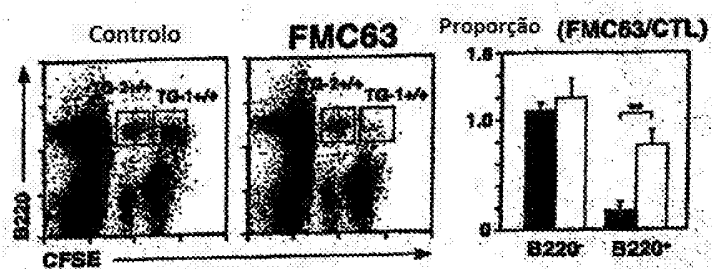
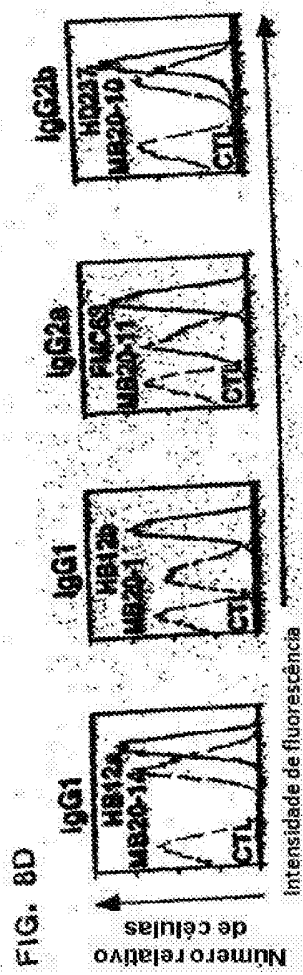


FIG. 8C



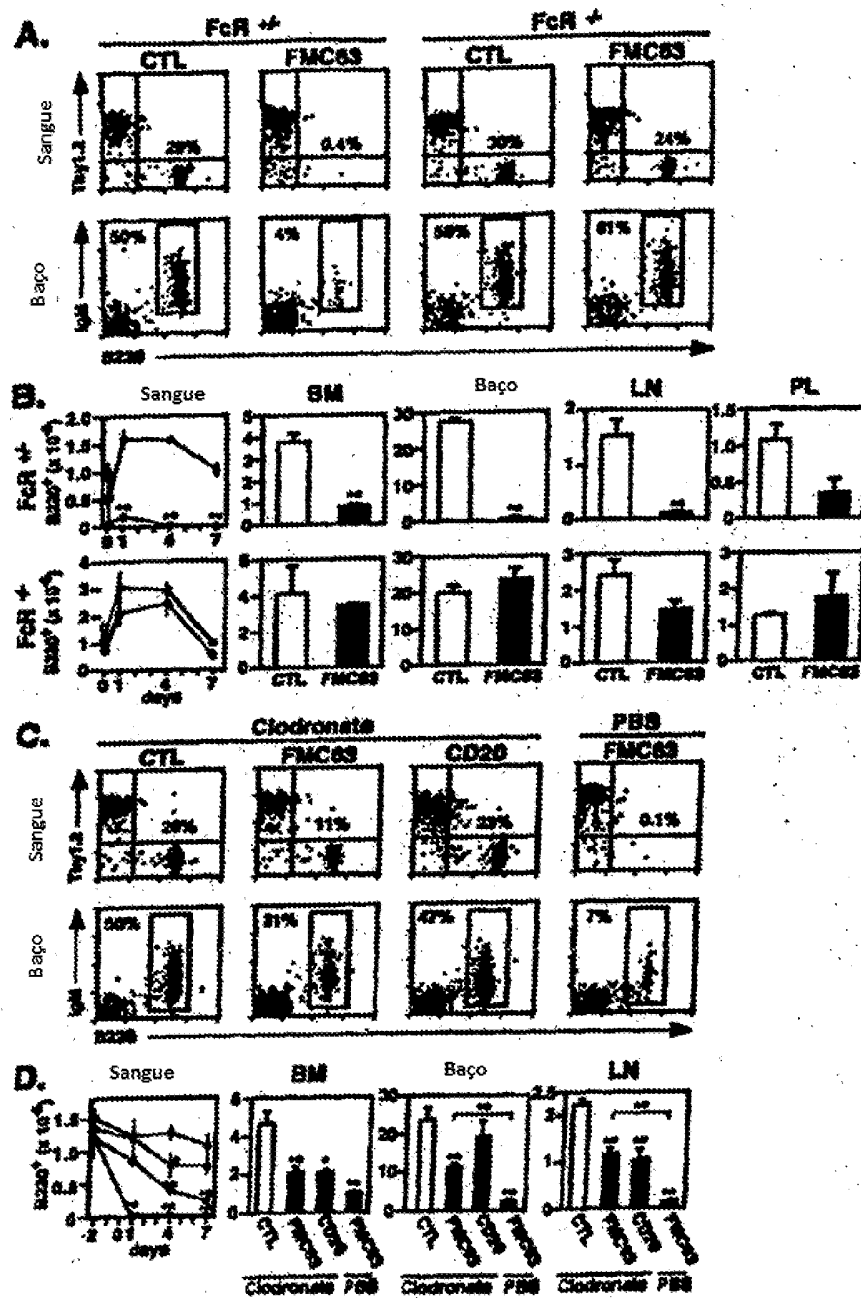


Figura 9

FIG. 10A

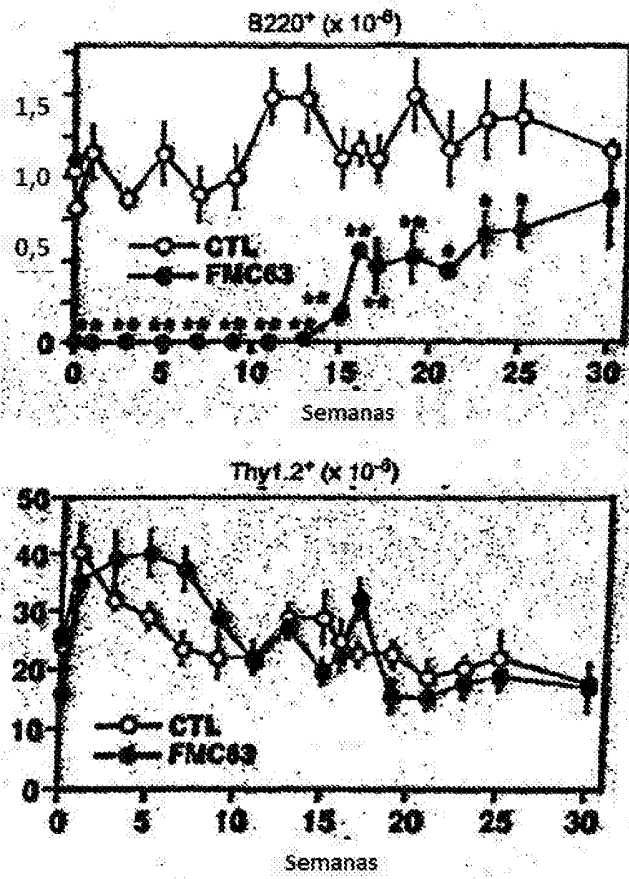


FIG. 10B

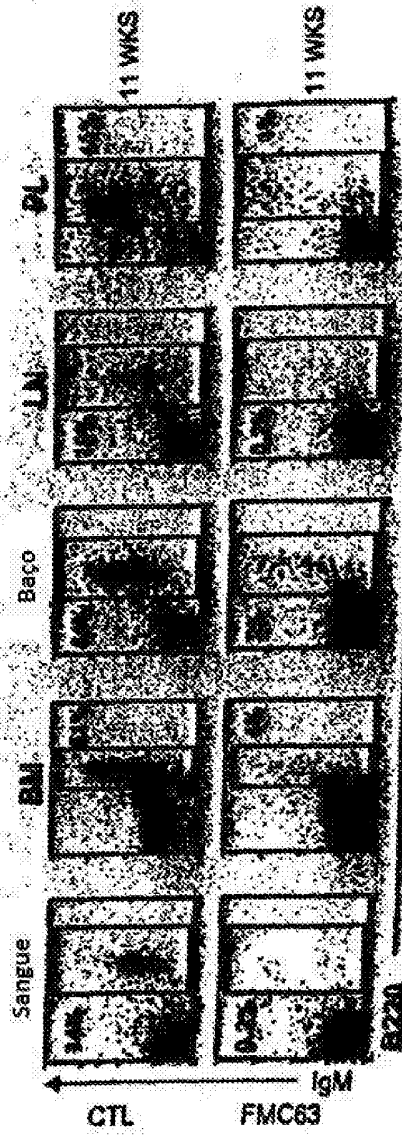


FIG. 10C

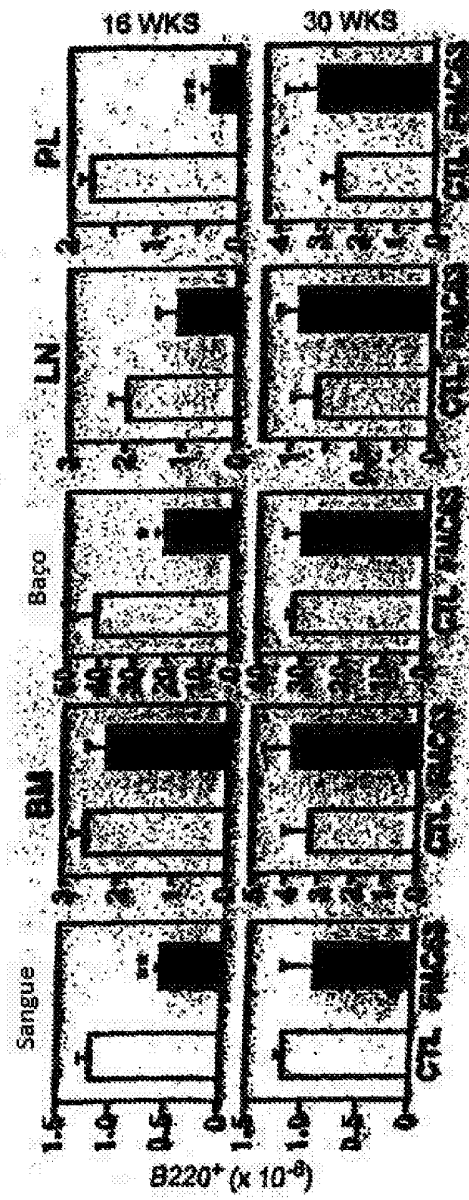


FIG. 10D

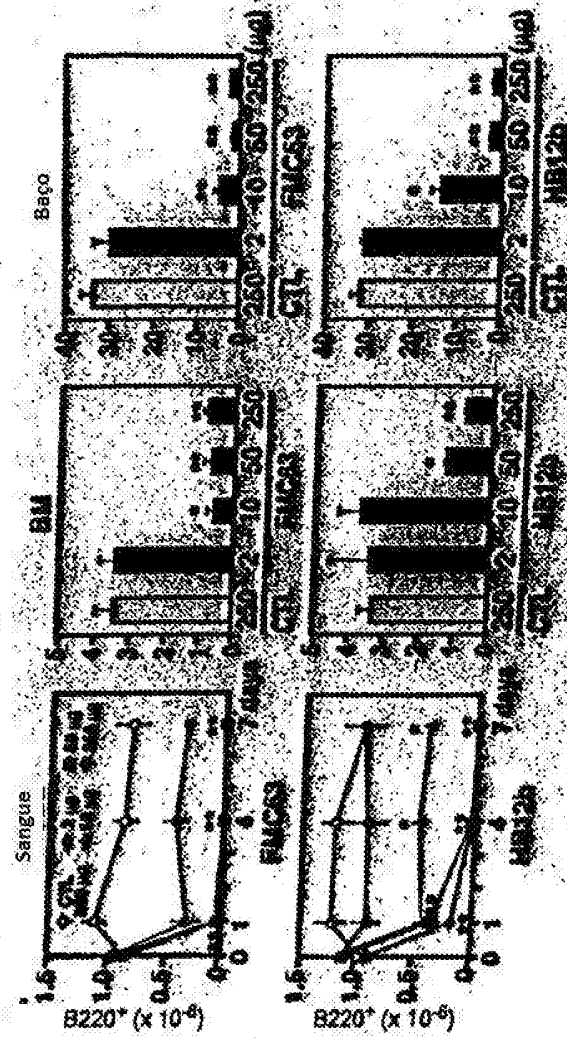


FIG. 11A

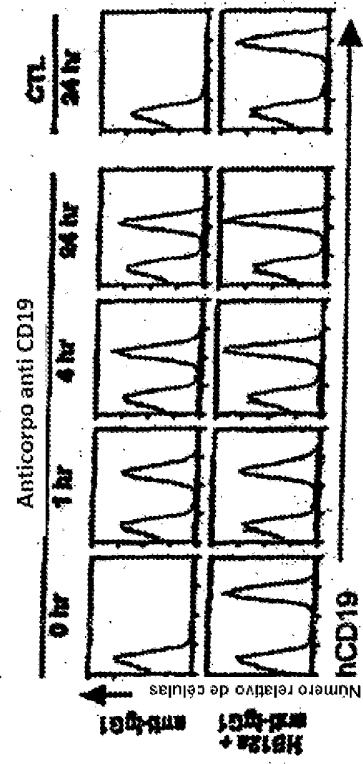


FIG. 11B

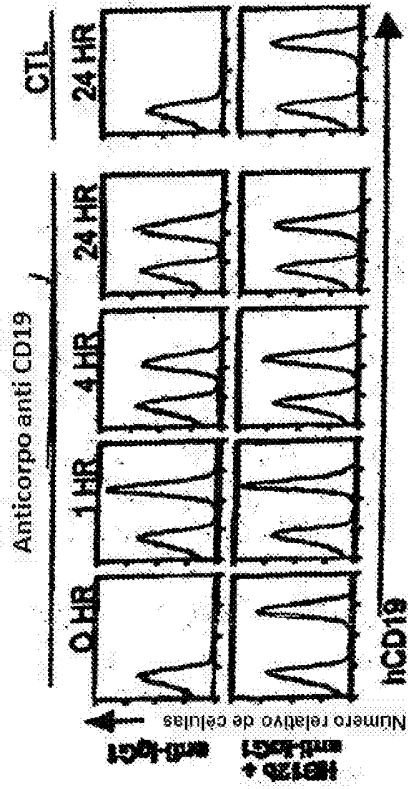
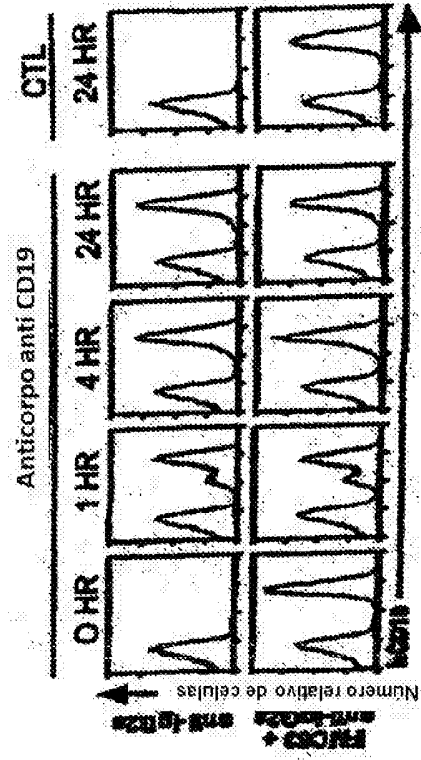


FIG. 11C



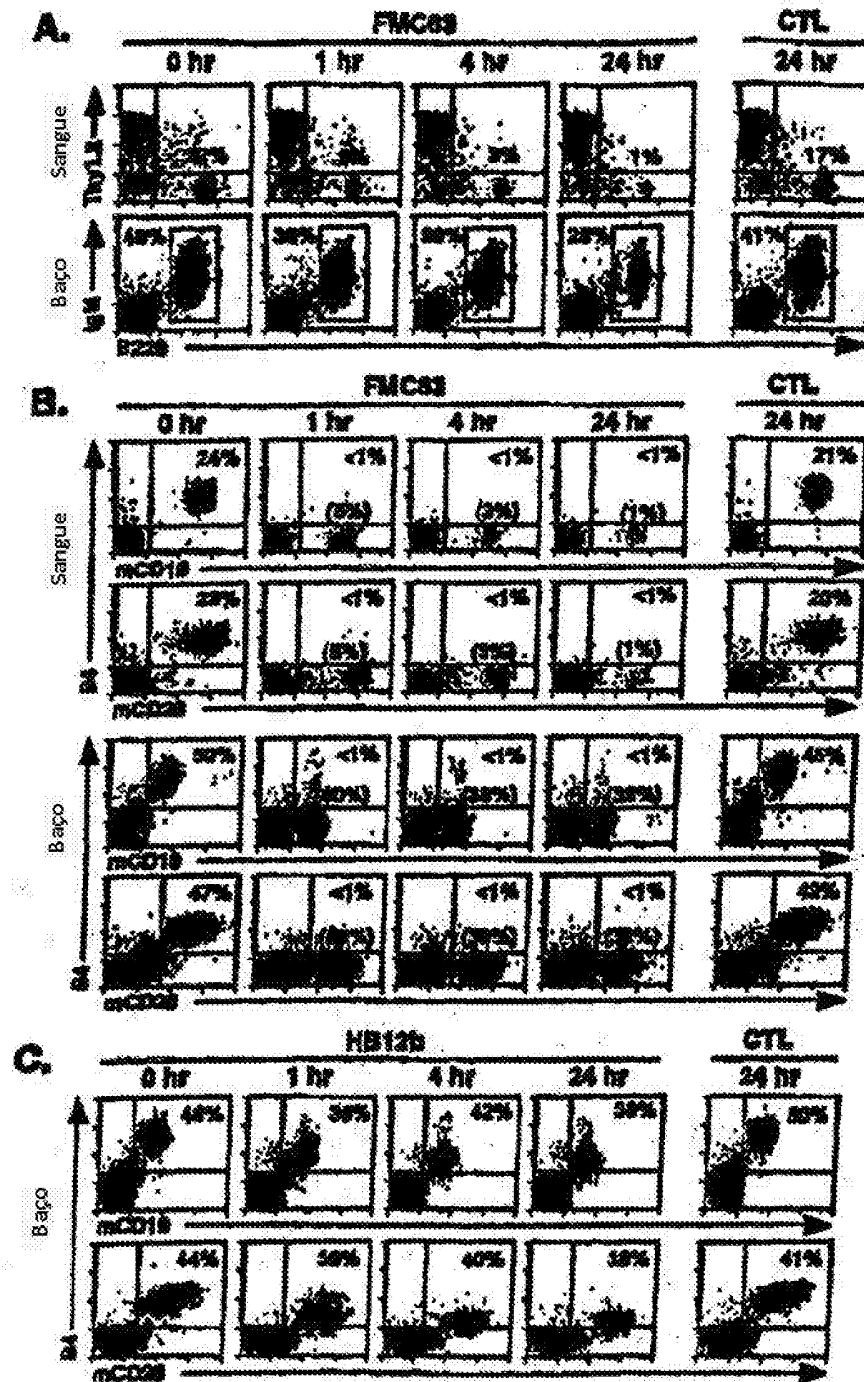


Figura 12

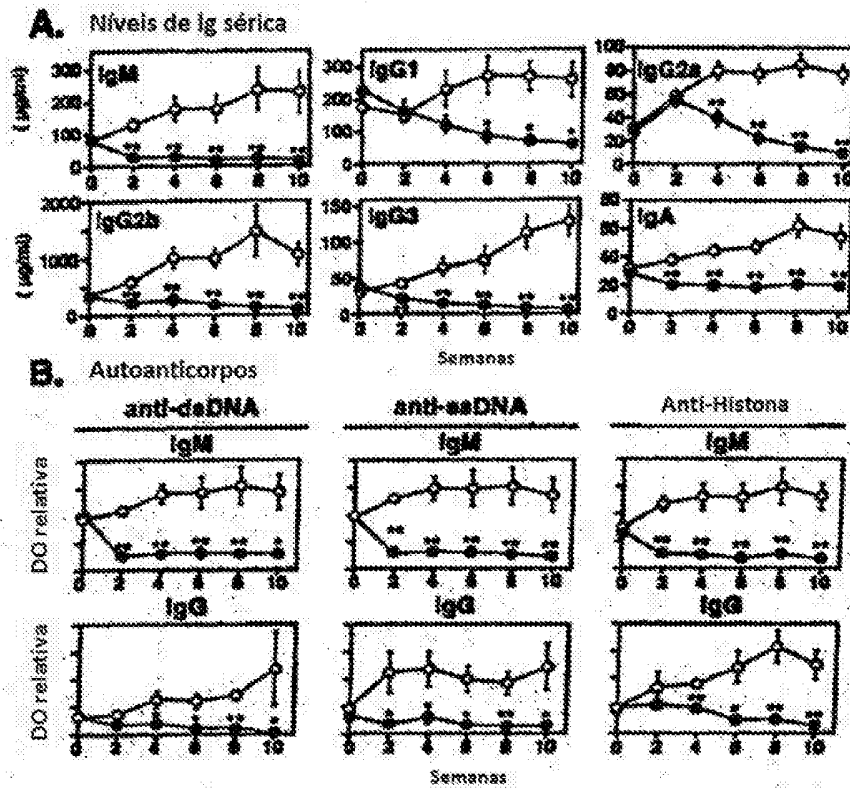


Figura 12

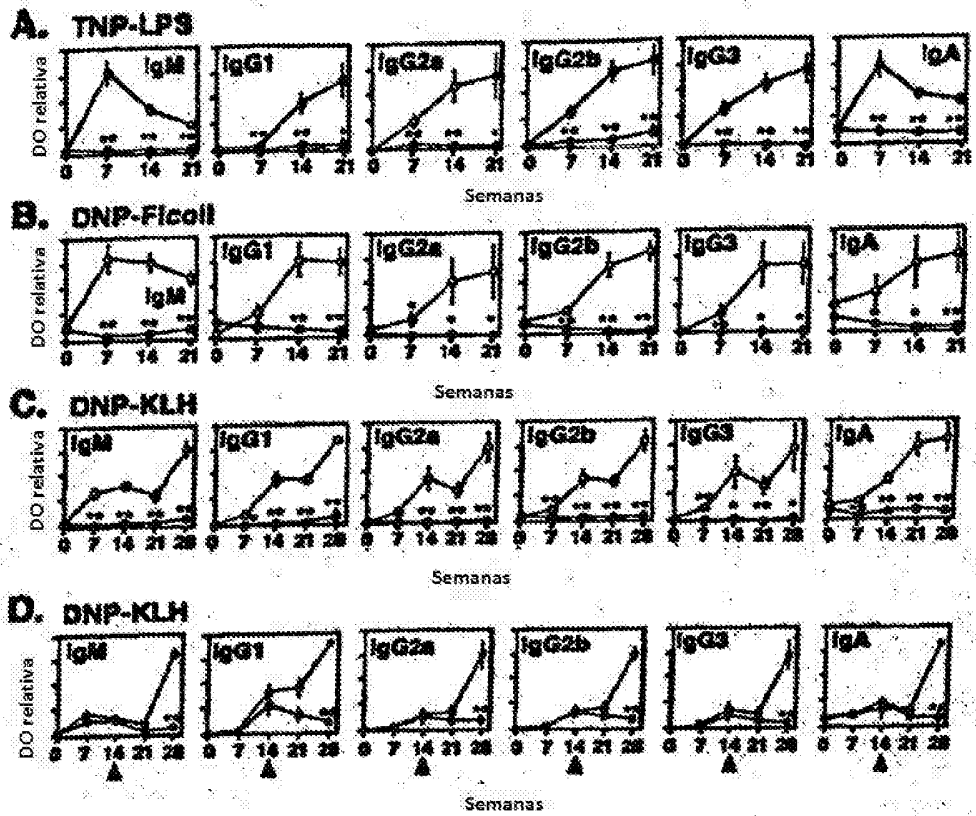
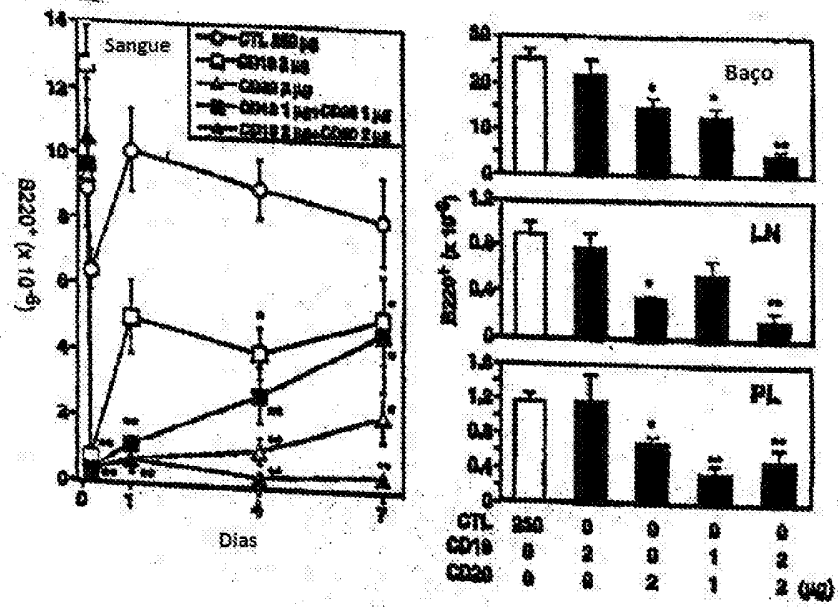


Figura 14

FIG. 15



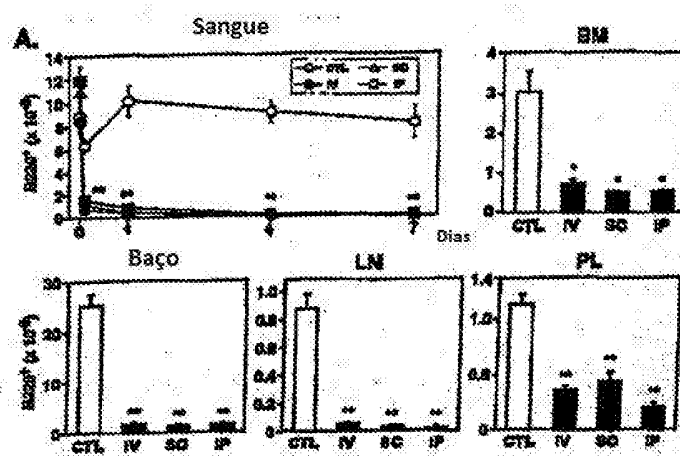


Figura 16

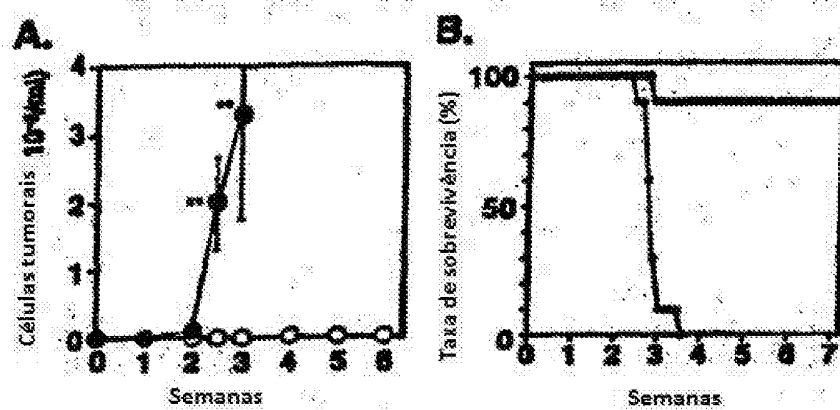


Figura 17