



República Federativa do Brasil

Ministério da Indústria, Comércio Exterior

e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9909860-1 B1

(22) Data do Depósito: 21/04/1999

(45) Data de Concessão: 31/05/2016



(54) Título: POLIPEPTÍDEO MULTIFUNCIONAL DE CADEIA SIMPLES, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA PROCARIÓTICA, DE LEVEDURA OU UNICELULAR, COMPOSIÇÃO, USOS DE POLIPEPTÍDEO E POLINUCLEOTÍDEO E MÉTODOS PARA PREPARO DO REFERIDO POLIPEPTÍDEO E PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATIVADORES OU INIBIDORES DE ATIVAÇÃO OU ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS T

(51) Int.Cl.: C12N 5/10; C12N 15/62; C12N 15/85; C07K 16/46; C07K 19/00; A61K 39/395; A61K 48/00; G01N 33/577

(30) Prioridade Unionista: 21/04/1998 EP 98107269.7

(73) Titular(es): AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH

(72) Inventor(es): BERND DOERKEN, GERT RIETHMUELLER, PETER KUFER, RALF LUTTERBUESE, ANJA LOEFFLER, RALF BARGOU

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"POLIPEPTÍ-
DEO MULTIFUNCIONAL DE CADEIA SIMPLES, POLINUCLEOTÍDEO,
VETOR, CÉLULA PROCARIÓTICA, DE LEVEDURA OU UNICELULAR,
COMPOSIÇÃO, USOS DE POLIPEPTÍDEO E POLINUCLEOTÍDEO E MÉ-**
5 **TODOS PARA PREPARO DO REFERIDO POLIPEPTÍDEO E PARA IDEN-**
TIFICAÇÃO DE ATIVADORES OU INIBIDORES DE ATIVAÇÃO OU ESTI-
MULAÇÃO DAS CÉLULAS T".

A presente invenção refere-se a novos polipeptídeos multifun-
cionais de cadeia simples compreendendo pelo menos dois locais de ligação
10 específicos para os antígenos CD19 e CD3, respectivamente. A presente
invenção ainda refere-se a um polipeptídeo em que o polipeptídeo acima
descrito compreende pelo menos um outro domínio, de preferência de fun-
ção predeterminada. Além disso, a presente invenção refere-se a polinucleo-
tídeos que codificam os referidos polipeptídeos, bem como a vetores com-
15 prendendo os referidos polinucleotídeos e a células hospedeiras transfor-
madas com os mesmos e seu uso na produção dos referidos polipeptídeos.
Além disso, a presente invenção refere-se a composições, de preferência
composições farmacêuticas e diagnósticas, compreendendo qualquer um
dos polipeptídeos, polinucleotídeos ou vetores antes descritos. Um outro
20 objetivo da presente invenção é o uso dos polipeptídeos, polinucleotídeos e
vetores antes mencionados para o preparo de composições farmacêuticas
para imunoterapia, de preferência contra malignidades das células B, tal co-
mo linfoma não-Hodgkin.

Muitos documentos são citados no decorrer do texto da presen-
25 te especificação. Cada um dos documentos citados aqui (incluindo qual-
quer uma das especificações dos fabricantes, instruções, etc.) são aqui
incorporados por referência; contudo, não há reconhecimento de que qual-
quer documento citado aqui é, na verdade, a técnica anterior da presente
invenção.

A despeito da importância médica, a pesquisa em doenças mediadas pelas células B tal como linfoma não-Hodgkin, tem produzido somente um pequeno número de dados clinicamente utilizáveis e as abordagens convencionais para curar tais doenças permanecem cansativas e desagradáveis e/ou possuem um alto risco de reincidência. Por exemplo, embora doses elevadas de quimioterapia como um tratamento primário para linfoma não-Hodgkin de alto grau possam melhorar a sobrevivência como um todo, cerca de 50% dos pacientes ainda morrem dessa doença (2-4). Além disso, leucemia linfática crônica semelhante a linfoma não-Hodgkin de

baixo grau e linfoma das células do manto ainda são incuráveis. Isso tem estimulado a busca por estratégias alternativas tal como a imunoterapia. Anticorpos dirigidos contra as moléculas da superfície celular definidas pelos antígenos CD representam uma oportunidade única para o desenvolvimento de reagentes terapêuticos.

A expressão de determinados antígenos CD é altamente restrita a células linfo-hematopoiéticas de linhagem específica e nos últimos anos, anticorpos dirigidos contra antígenos linfóide-específicos têm sido usados para desenvolver tratamentos que eram efetivos *in vitro* ou em modelos em animais (5-13). A esse respeito, o CD19 provou ser um alvo muito útil. O CD19 é expresso em toda a linhagem B das células pró B até a célula B madura, não é vertido, é uniformemente expresso em todas as células de linfoma e está ausente das células do tronco (8, 14). Uma modalidade interessante é a aplicação de um anticorpo biespecífico com uma especificidade para o antígeno CD19 e a outra para o CD3 sobre células T. Contudo, anticorpos biespecíficos assim disponíveis sofrem de baixa citotoxicidade para as células T e precisam de agentes co-estimulatórios de forma a mostrar atividade biológica satisfatória.

Assim, o problema técnico que fundamenta a presente invenção foi o de proporcionar meios e métodos úteis para o tratamento de doenças mediadas pelas células B tal como várias formas de linfoma não-Hodgkin. A solução para o referido problema técnico é obtida através do fornecimento das concretizações caracterizadas nas reivindicações.

Conseqüentemente, a presente invenção refere-se a um polipeptídeo multifuncional de cadeia simples compreendendo:

- (a) um primeiro domínio compreendendo um local de ligação de uma cadeia de imunoglobulina ou um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno CD19; e
- (b) um segundo domínio compreendendo um local de ligação de uma cadeia de imunoglobulina ou um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno CD3.

Os termos "primeiro domínio" e "segundo domínio", de acordo

com a presente invenção, significam que um local de ligação é dirigido contra o identificador CD19 das células B, o qual é uniformemente expresso na grande maioria das células B malignas, o outro local de ligação é dirigido contra o antígeno CD3 das células T humanas. O termo "local de ligação",
5 conforme usado de acordo com a presente invenção, denota um domínio compreendendo uma estrutura tridimensional capaz de se ligar especificamente a um epítipo tal como anticorpos nativos, fragmentos scFv livres ou uma de suas cadeias correspondentes de imunoglobulina, de preferência a cadeia V_H. Assim, o referido domínio pode compreender o domínio V_H e/ou
10 V_L de um anticorpo ou uma cadeia de imunoglobulina, de preferência pelo menos o domínio V_H. Por outro lado, os referidos locais de ligação contidos no polipeptídeo da invenção podem compreender pelo menos uma região determinadora de complementaridade (CDR) de um anticorpo ou uma cadeia de imunoglobulina que reconhece os antígenos CD19 e CD3, respectivamente. A esse respeito, é observado que os domínios dos locais de ligação
15 presentes no polipeptídeo da invenção podem ser derivados não somente de anticorpos, mas também de outras proteínas de ligação CD19 ou CD3, tal como receptores ou ligantes superficiais que ocorrem naturalmente. De acordo com a invenção, o referido local de ligação está compreendido
20 em um domínio.

O termo "polipeptídeo multifuncional", conforme usado aqui, denota um polipeptídeo compreendendo pelo menos duas seqüências de aminoácido derivadas de origens diferentes, isto é, de duas moléculas diferentes, opcionalmente derivadas de espécies diferentes em que pelo menos
25 duas das referidas origens especificam os locais de ligação. Conseqüentemente, os referidos locais de ligação especificam as funções ou pelo menos algumas funções do referido peptídeo multifuncional. Tais polipeptídeos incluem, por exemplo, anticorpos biespecíficos de cadeia simples (bsc).

O termo "cadeia simples", conforme usado de acordo com a
30 presente invenção, significa que os referidos primeiro e segundo domínios do polipeptídeo são covalentemente ligados, de preferência na forma de uma seqüência de aminoácido co-linear codificável por uma molécula de

ácido nucléico. CD19 denota um antígeno que é expressão na linhagem B tal como nas células pró B e nas células B maduras, não é vertido, é uniformemente expresso em todas as células de linfoma e está ausente das células do tronco (8, 14).

5 CD3 denota um antígeno que é expresso sobre células T como parte do complexo receptor de células T multimolecular e que consiste em três cadeias diferentes, CD3 ϵ , CD3 δ e CD3 γ . O acúmulo de CD3 sobre as células T, por exemplo, através de anticorpos anti CD3 imobilizados, leva à ativação das células T similar ao envolvimento do receptor de células T,
10 mas independente de sua especificidade clone típica. Realmente, a maioria dos anticorpos anti CD3 reconhece a cadeia CD3 ϵ .

Anticorpos que reconhecem especificamente o antígeno CD19 ou CD3 são descritos na técnica anterior, por exemplo, em (24), (25) e (43), respectivamente e podem ser gerados por meio de métodos convencionais
15 conhecidos na técnica.

Já foi mostrado que anticorpos CD19xCD3 biespecíficos os quais não são de formato em cadeia simples, re-objetivando a citotoxicidade das células T em células de linfoma de uma maneira MHC-independente são efetivos *in vitro* (5, 6, 9-11, 13, 43), em modelos em animais (7, 28), bem
20 como em alguns experimentos clínicos pilotos (12, 29, 30). Até o momento, esses anticorpos têm sido construídos através de técnicas de hibridoma-híbrido, através de ligação covalente de anticorpos monoclonais (31) ou através da abordagem de diacopo (43). Estudos clínicos mais extensos têm sido impedidos pelo fato de que esses anticorpos possuem baixa atividade
25 biológica, de modo que altas dosagens têm de ser aplicadas e que a aplicação dos anticorpos apenas não proporciona um efeito terapêutico benéfico. Além disso, a disponibilidade do material de grau clínico era limitada.

Sem estar preso a uma teoria em particular, acredita-se que o uso do formato de anticorpos biespecíficos conforme definido acima, assim,
30 gerando polipeptídeos tais como anticorpos CD19xCD3 biespecíficos, pode ser usualmente capaz de destruir células alvo CD19-positivas através do recrutamento de linfócitos T citotóxicos sem qualquer necessidade de pré-

e/ou co-estimulação das células T. Isso está em acentuado contraste a todos os anticorpos CD19xCD3 biespecíficos conhecidos produzidos de acordo com outros formatos moleculares e usualmente não depende das especificidades do anticorpo CD19 ou CD3 em particular usadas para construir, por exemplo, o anticorpo biespecífico com cadeia simples. A independência de pré- e/ou co-estimulação das células T pode contribuir substancialmente para a citotoxicidade excepcionalmente elevada mediada pelo polipeptídeo da invenção, conforme exemplificado pelo anticorpo biespecíficos CD19xCD3 particular descrito nos exemplos.

Uma outra propriedade vantajosa do polipeptídeo da invenção é que, devido a sua estrutura pequena relativamente compacta, ele é fácil de produzir e purificar, dessa forma, superando os problemas de baixos rendimentos, ocorrência de subprodutos mal definidos ou procedimentos trabalhosos de purificação (15-19) relatados com relação aos anticorpos CD19xCD3 específicos até agora produzidos a partir de hibridomas-híbridos, através de ligação química ou através de renaturação a partir de corpos bacterianos de inclusão. A seguir, as propriedades vantajosas e inesperadas do polipeptídeo da invenção serão discutidas de uma maneira não-limitativa orientada pelos exemplos em anexo, incluindo algumas das concretizações preferidas da invenção referidas aqui abaixo, as quais ilustram o amplo conceito da presente invenção.

De acordo com a presente invenção, um sistema eucariota de expressão foi usado, o qual tinha sido desenvolvido para a produção de anticorpos biespecíficos recombinantes de cadeia simples (1) de forma a gerar um anticorpo CD19xCD3 biespecífico recombinante de cadeia simples através da expressão de células CHO. O anticorpo completamente funcional foi facilmente purificado a partir do sobrenadante da cultura por meio de seu tag C-terminal de histidina em uma coluna de cromatografia Ni-NTA. A ligação específica ao CD19 e CD3 foi demonstrada através de análise por FACS. A molécula bscCD19xCD3 (CD19xCD3 biespecífica de cadeia simples) da invenção mostrou algumas propriedades inesperadas:

- ela induziu a citotoxicidade das células T dirigida contra linfo-

mas *in vitro* e *in vivo*. Mesmo em concentrações muito baixas de 10-100 pg/ml e baixas proporções E (efetuador):T (alvo) de 5:1 e 2,5:1, lise específica significativa de linhas de células de linfoma foi observada. Além disso, 3 µg a 10 µg da molécula bscCD19xCD3 da invenção em uso compassivo
5 mostrou uma melhora clara e significativa do estado médico. Comparado aos anticorpos CD19xCD3 até o momento publicados produzidos através de técnicas de hibridoma-híbridos ou através de abordagens de diacorpo (a qual também representa um formato diferente), os quais mostram atividade citotóxica na faixa de muitos nanogramas/ml ou mesmo µg/ml, o anticorpo
10 bscCD19xCD3 da invenção parece ser muito mais eficaz (5-7, 27, 43), por exemplo, conforme documentado nos exemplos em anexo 4, 5 e 7;

- mesmo baixas concentrações do bscCD19xCD3 da invenção foram capazes de induzir citotoxicidade rápida dirigida a linfomas (após 4 horas) em baixas proporções E:T sem a necessidade de qualquer pré-
15 estimulação das células T. Em contraste, um anticorpo CD19xCD3 biespecífico convencional (5-7, 27) não mostrou atividade citotóxica significativa sob essas condições (isto é, nenhuma pré-estimulação das células T, baixa proporção E:T), mesmo em elevadas concentrações de até 3000 ng/ml. Embora a indução da atividade citotóxica sem pré-estimulação também tenha
20 sido relatada no caso de outro anticorpo CD19xCD3 convencional, esse efeito foi obtido somente em altas concentrações e elevadas proporções E:T (100 pg/ml, 27:1) (()), comparado ao bscCD19xCD3 da invenção (100 pg/ml, 2,5:1). Além disso, um efeito citotóxico desse anticorpo convencional foi observado somente após 1 dia de pré-estimulação com o anticorpo biespecífi-
25 co em si, ao passo que o bscCD19xCD3 da invenção induziu a citotoxicidade de linfoma-dirigida já após 4 horas. Pelo que os inventores sabem, tal atividade citotóxica rápida e específica das células T não-estimuladas em tais concentrações e proporções E:T baixas não tinha sido descrita com relação aos outros anticorpos biespecíficos usados até o momento. Embora recen-
30 temente um anticorpo F(ab)₂ biespecífico anti-p185HER2/anti-CD3 tenha mostrado induzir a atividade citotóxica em concentrações similares às do bscCD19xCD3 da invenção, esse anticorpo requereu pré-estimulação de 24

horas com IL-2 (32). Assim, o anticorpo bscCD19xCD3 da invenção revela propriedades citotóxicas únicas que discriminam sua molécula dos outros anticorpos biespecíficos que foram descritos.

O bscCD19xCD3 da invenção media efeitos citotóxicos que são
5 antígeno específicos, demonstrado pelo fato de que:

- esse anticorpo falhou em submeter à lise as linhas de células de plasmacitoma NCI e L363, as quais são linhas de células da linhagem B que não expressam o antígeno CD19; e

- a citotoxicidade contra células de linfoma pôde ser bloqueada
10 pelo anticorpo anti-CD19 original HD37. (O anticorpo HD37 é derivado do hibridoma HD37 (22)).

O bloqueio da via de perforina através de privação de cálcio com EGTA bloqueou completamente a citotoxicidade bscCD19xCD3-mediada, sugerindo que a lise específica é um efeito mediado pelas células
15 T ao invés de um efeito direto do anticorpo em si.

Tomados juntos, o anticorpo bscCD19xCD3 construído de acordo com o ensinamento geral da invenção é superior aos anticorpos CD19xCD3 biespecíficos descritos até o momento com relação a sua atividade biológica consideravelmente mais alta, bem como a possibilidade de
20 sua produção rápida e fácil, dessa forma, proporcionando quantidades suficientes de material de grau clínico com alta qualidade.

Portanto, espera-se que as moléculas bscCD19xCD3 da invenção sejam um candidato adequado para provar o benefício terapêutico dos anticorpos biespecíficos no tratamento de doenças mediadas pelas células
25 B, tal como linfoma não-Hodgkin, em experimentos clínicos.

Em uma concretização preferida do polipeptídeo da invenção, os referidos domínios são unidos por um ligante de polipeptídeo. O referido ligante está disposto entre os referidos primeiro e segundo domínios, em que o ligante de polipeptídeo compreende, de preferência, vários aminoácidos hidrofílicos ligados por peptídeo e conecta a extremidade N-terminal do
30 referido primeiro domínio à extremidade C-terminal do referido segundo domínio.

Em uma outra concretização preferida da invenção, os referidos primeiro e/ou segundo domínios do polipeptídeo acima descrito imitam ou correspondem a uma região V_H e V_L de um anticorpo natural. O anticorpo que proporciona o local de ligação para o polipeptídeo da invenção pode ser, por exemplo, um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado, um anticorpo biespecífico, um anticorpo sintético, um fragmento de anticorpo tal como fragmentos Fab, Fv ou scFv, etc., ou um derivado quimicamente modificado de qualquer um desses. Anticorpos monoclonais podem ser preparados, por exemplo, por meio das técnicas conforme originalmente descrito em Köhler e Milstein, Nature 256 (1975), 495 e Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, as quais compreendem a fusão de células de mieloma de camundongo à células do baço derivadas de mamíferos imunizados com modificações desenvolvidas pela técnica. Além disso, anticorpos ou fragmentos dos mesmos dos antígenos antes mencionados podem ser obtidos através do uso de métodos os quais são descritos, por exemplo, em Harlow e Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. Os anticorpos poderiam ser obtidos de várias espécies, incluindo seres humanos. Quando derivados dos referidos anticorpos são obtidos através da técnica de visualização de fago, ressonância de superfície de plasmon, conforme empregado no sistema BIAcore, pode ser usada a fim de aumentar a eficácia dos anticorpos de fago os quais se ligam a um epítipo do antígeno CD19 ou CD3 (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). A produção de anticorpos quiméricos é descrita, por exemplo, no WO 89/09622. Métodos para a produção de anticorpos humanizados são descritos, por exemplo, no EP-A1 0 239 400 e WO 90/07861. Uma outra fonte de anticorpos a ser utilizada de acordo com a presente invenção são os assim denominados anticorpos xenogênicos. O princípio geral para a produção de anticorpos xenogênicos tal como anticorpos humanos em camundongos é descrito, por exemplo, no WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 e WO 96/33735.

Os anticorpos a serem empregados de acordo com a invenção

ou sua(s) cadeia(s) correspondente de imunoglobulina pode ser ainda modificado usando-se métodos convencionais conhecidos na técnica, por exemplo, através do uso de deleção(ões), inserção(ões), substituição(ões), adição(ões) e/ou recombinação(ões) de aminoácidos e/ou qualquer (quais-

5 quer) outra(s) modificação(ões) conhecidas(s) na técnica, sozinha(s) ou em combinação. Métodos para a introdução de tais modificações na seqüência de DNA que fundamenta a seqüência de aminoácido de uma cadeia de imunoglobulina são bem conhecidos por aqueles versados na técnica; veja, por exemplo, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold

10 Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. A modificação referida é, de preferência, realizada a nível de ácido nucléico.

Em uma outra concretização da invenção, pelo menos um dos referidos domínios no polipeptídeo acima descrito é um fragmento de cadeia simples da região variável do anticorpo.

15 Como é bem conhecido, Fv, o fragmento mínimo de anticorpo o qual contém um local completo de reconhecimento e ligação ao antígeno, consiste em um dímero de um domínio variável com uma cadeia pesada e uma cadeia leve (V_H e V_L) em associação não-covalente. Nessa configuração que corresponde àquela encontrada em anticorpos nativos, as três re-

20 giões de determinação de complementaridade (CDRs) de cada domínio variável interagem a fim de definir um local de ligação ao antígeno sobre a superfície do dímero V_H - V_L . Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação ao antígeno ao anticorpo. As estruturas (FRs) que flanqueiam as CDRs possuem uma estrutura a qual é essencialmente conser-

25 vada nas imunoglobulinas nativas de espécies tão diversas quanto seres humanos e camundongos. Essas FRs servem para manter as CDRs em sua orientação apropriada. Os domínios constantes não são requeridos para a função de ligação, mas podem auxiliar na estabilização da interação V_H - V_L . Mesmo um único domínio variável (ou metade de um Fv compreendendo

30 somente três CDRs específicas para um antígeno) possui a capacidade de reconhecer e se ligar ao antígeno, embora usualmente em uma afinidade menor do que um local inteiro de ligação (Painter, Biochem. 11 (1972),

1327-1337). Conseqüentemente, o referido domínio do local de ligação do polipeptídeo da invenção pode ser um par de domínios V_H - V_L , V_H - V_H ou V_L - V_L das mesmas ou de imunoglobulinas diferentes. A ordem dos domínios V_H e V_L dentro da cadeia do polipeptídeo não é decisiva para a presente invenção, a ordem dos domínios fornecida aqui acima pode ser invertida usualmente sem qualquer perda de função. É importante, contudo, que os domínios V_H e V_L estejam dispostos de modo que o local de ligação ao antígeno possa ser apropriadamente duplicado.

Em uma concretização preferida dos polipeptídeos da invenção, os referidos domínios estão dispostos na ordem V_L CD19- V_H CD19- V_H CD3- V_L CD3, em que " V_L " e " V_H " significam a cadeia leve e pesada do domínio variável dos anticorpos anti-CD19 e anti-CD3 específicos.

Conforme discutido acima, os referidos locais de ligação são, de preferência, conectados através de um ligante flexível, de preferência através de um ligante de polipeptídeo disposto entre os referidos domínios, em que o referido ligante de polipeptídeo compreende vários aminoácidos hidrofílicos ligados por peptídeo de um comprimento suficiente para cobrir a distância entre a extremidade C-terminal de um dos referidos domínios compreendendo os referidos locais de ligação e a extremidade N-terminal do outro dos referidos domínios compreendendo os referidos locais de ligação quando o polipeptídeo da invenção assume uma conformação adequada para ligação quando disposto em solução aquosa. De preferência, o referido ligante de polipeptídeo compreende uma pluralidade de resíduos de glicina, alanina e/ou serina. É ainda preferido que o referido ligante de polipeptídeo compreenda uma pluralidade de cópias consecutivas de uma sequência de aminoácido. Usualmente, o ligante de polipeptídeo compreende de 1 a 15 aminoácidos, embora ligantes de polipeptídeo de mais do que 15 aminoácidos possam trabalhar também.

Em uma concretização preferida da invenção, o referido ligante de polipeptídeo compreende de 1 a 5 resíduos de aminoácido. Em uma concretização particularmente preferida da presente invenção, o referido ligante de polipeptídeo no polipeptídeo da invenção compreende 5 aminoácidos.

Conforme demonstrado nos exemplos em anexo, o referido ligante de polipeptídeo compreende, vantajosamente, a seqüência de aminoácido Gly Gly Gly Gly Ser.

Em uma outra concretização particularmente preferida, o referido primeiro domínio do polipeptídeo da invenção compreende pelo menos uma CDR da região V_H e V_L compreendendo a seqüência de aminoácido codificada pela seqüência de DNA representada na Figura 8, dos nucleotídeos 82 a 414 (V_L) e dos nucleotídeos 460 a 831 (V_H) e/ou o referido segundo domínio compreende pelo menos uma CDR, mais preferivelmente duas, ainda mais preferivelmente três CDRs da região V_H e V_L compreendendo a seqüência de aminoácido codificada pela seqüência de DNA representada na Figura 8, dos nucleotídeos 847 a 1203 (V_H) e dos nucleotídeos 1258 a 1575 (V_L), opcionalmente em combinação com regiões estruturais que ocorrem junto com as referidas CDRs em anticorpos originais. As CDRs contidas nas regiões variáveis representadas na Figura 8 podem ser determinadas, por exemplo, de acordo com Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (U.S. Department of Health and Human Services, terceira edição, 1983; quarta edição, 1987; quinta edição, 1990). Aqueles versados na técnica apreciarão prontamente que o local de ligação ou pelo menos uma CDR derivada do mesmo pode ser usado para a construção de um polipeptídeo da invenção. De preferência, o referido polipeptídeo compreende a seqüência de aminoácido codificada pela seqüência de DNA representada na Figura 8, dos nucleotídeos 82 a 1575. Aqueles versados na técnica apreciarão prontamente que os locais de ligação do polipeptídeo da invenção podem ser construídos de acordo com métodos conhecidos na técnica, por exemplo, conforme descrito no EP-A1 0 451 216 e EP-A1 0 549 581.

Os domínios dos locais de ligação do polipeptídeo da invenção possuem, de preferência, uma especificidade pelo menos substancialmente idêntica à especificidade de ligação, por exemplo, do anticorpo ou cadeia de imunoglobulina a partir de onde eles são derivados. Tais domínios do local de ligação podem ter uma elevada afinidade de pelo menos $10^5 M^{-1}$, de

preferência não maior do que 10^7 M^{-1} com relação ao antígeno CD3 e vantajosamente até 10^{10} M^{-1} ou maior com relação ao antígeno CD19.

Em uma concretização preferida do polipeptídeo da invenção:

(a) o referido local de ligação do primeiro domínio possui uma
5 afinidade de pelo menos cerca de 10^{-7} M , de preferência pelo menos cerca de 10^{-9} M e mais preferivelmente pelo menos cerca de 10^{-11} M ; e/ou

(b) o referido local de ligação do segundo domínio possui uma
afinidade de pelo menos cerca de 10^{-7} M , de preferência menos do que cerca de 10^{-6} M e mais preferivelmente da ordem de 10^{-5} M .

10 De acordo com as concretizações preferidas referidas acima, é vantajoso se o local de ligação que reconhece o antígeno CD19 possui uma elevada afinidade de forma a capturar as células alvo a serem destruídas com alta eficiência. Por outro lado, a afinidade de ligação do local de ligação que reconhece o antígeno CD3 seria da ordem daquela do receptor
15 natural de CD3 ou daquela usualmente encontrada para a interação do receptor de células T com seu ligante, que é um complexo de peptídeo-MHC sobre a superfície da célula alvo. Em outra concretização preferida da invenção, o polipeptídeo descrito acima é um anticorpo de cadeia simples bi-específico.

20 A presente invenção ainda refere-se a um polipeptídeo compreendendo pelo menos um outro domínio, o referido domínio sendo ligado por ligações covalentes ou não covalentes.

A ligação pode ser baseada sobre fusão genética de acordo com os métodos conhecidos na técnica e descritos acima ou pode ser realizada, por exemplo, através de ligação transversal conforme descrito, por
25 exemplo, no WO 94/04686. O domínio adicional presente no polipeptídeo da invenção pode, de preferência, ser ligado através de um ligante flexível, vantajosamente um ligante de polipeptídeo a um dos domínios do local de ligação, em que o referido ligante de polipeptídeo compreende vários aminoácidos hidrofílicos ligados por peptídeo de um comprimento suficiente
30 para cobrir a distância entre a extremidade C-terminal de um dos referidos domínios e a extremidade N-terminal do outro dos referidos domínios quan-

do o referido polipeptídeo assume uma conformação adequada para ligação quando disposto em solução aquosa. De preferência, o referido ligante de polipeptídeo é um ligante de polipeptídeo conforme descrito nas concretizações aqui antes. O polipeptídeo da invenção pode ainda compreender um
5 ligante clivável ou local de clivagem para proteinases, tal como enterocina-se; veja também os exemplos em anexo.

Além disso, o referido domínio adicional pode ser de uma especificidade ou função predefinida. Por exemplo, a literatura contém uma lista de referências ao conceito de objetivação de substâncias bioativas tais
10 como drogas, toxinas e enzimas a fim de especificar pontos no corpo a ser destruído ou localizar células malignas ou induzir uma droga ou efeito enzimático localizado. Foi proposto obter esse efeito através de conjugação da substância bioativa a anticorpos monoclonais (veja, por exemplo, N.Y. Oxford University Press; e Ghose, J. Natl. Cancer Inst. 61 (1978), 657-676).

15 Nesse contexto, também é compreendido que os polipeptídeos de acordo com a invenção podem ainda ser modificados por meio de métodos convencionais conhecidos na técnica. Isso permite a construção de proteínas quiméricas compreendendo o polipeptídeo da invenção e outras seqüências funcionais de aminoácido, por exemplo, sinais de localização
20 nuclear, domínios de transativação, domínios de ligação a DNA, domínios de ligação a hormônio, tags de proteína (GST, GFP, peptídeo h-myc, FLAG, peptídeo HA), as quais podem ser derivadas de proteínas heterólogas. Conforme descrito nos exemplos em anexo, o polipeptídeo da invenção compreende, de preferência, um FLAG-tag de cerca de 8 aminoácidos de
25 comprimento; veja Figura 8.

Os polipeptídeos da invenção podem ser usados terapeuticamente em pacientes que sofrem de distúrbios das células B tal como linfoma das células B, leucemia linfática crônica derivadas de células B (B-CLL) e/ou tendo uma doença auto-imune relacionada às células B tais como mi-
30 astenia grave, Morbus Basedow, tireoidite de Hashimoto ou síndrome de Goodpasture. Tal terapia pode ser realizada, por exemplo, através da administração dos polipeptídeos da invenção. Tal administração pode utilizar

polipeptídeos rotulados bem como não-rotulados.

Por exemplo, os polipeptídeos da invenção poderiam ser administrados rotulados com um agente terapêutico. Esses agentes podem ser acoplados direta ou indiretamente aos anticorpos ou antígenos da invenção.

- 5 Um exemplo de acoplamento indireto é através do uso de uma metade espaçadora. Essas metades espaçadoras, por sua vez, podem ser insolúveis ou solúveis (Diener, Science 231 (1986), 148) e podem ser selecionadas a fim de possibilitar liberação da droga a partir do antígeno ao local alvo. Exemplos de agentes terapêuticos os quais podem ser acoplados aos poli-
- 10 peptídeos da invenção para imunoterapia são drogas, rádio-isótopos, lecitinas e toxinas. As drogas as quais podem ser conjugadas aos polipeptídeos da invenção incluem compostos os quais são classicamente referidos como drogas, tais como mitomicina C, daunorubicina e vinblastina.

- No uso de polipeptídeos rádio-isotopicamente conjugados da
- 15 invenção, por exemplo, para imunoterapia, determinados isótopos podem ser mais preferidos do que outros, dependendo de fatores tais como distribuição de leucócitos, bem como estabilidade e emissão. Dependendo da resposta auto-imune, alguns emissores podem ser preferíveis a outros. Em geral, rádio-isótopos que emitem partículas α e β são preferidos em imuno-
- 20 terapia. Preferidos são emissores α de alta energia e ondas curtas tais como ^{212}Bi . Exemplos de rádio-isótopos os quais podem ser ligados aos polipeptídeos da invenção para fins terapêuticos são ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{212}Bi , ^{212}At , ^{211}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd e ^{188}Re .

- Lecitinas são proteínas, usualmente isoladas de material vege-
- 25 tal, as quais se ligam a metades açúcar específicas. Muitas lecitinas também são capazes de aglutinar células e estimular linfócitos. Contudo, a ricina é uma lecitina tóxica a qual tem sido usada terapeuticamente. Isso é realizado através de ligação da cadeia de α -peptídeo da ricina, a qual é responsável pela toxicidade, ao polipeptídeo capaz de distribuir o efeito tóxico
- 30 a um local específico.

As toxinas são substâncias venenosas produzidas por plantas, animais ou microorganismos que, em dose suficiente são, muitas vezes,

letais. A toxina da difteria é uma substância produzida pela *Corynebacterium diphtheria*, a qual pode ser usada terapeuticamente. Essa toxina consiste em uma subunidade α e β as quais, sob condições apropriadas, podem ser separadas. O componente tóxico A pode ser ligado a um polipeptídeo da invenção e usado para distribuição local específica às células B e células T que interagem, as quais são mantidas em proximidade restrita, através de uma ligação a um polipeptídeo da invenção.

Outros agentes terapêuticos tal como descrito acima os quais podem ser acoplados ao polipeptídeo da invenção, bem como protocolos terapêuticos *ex vivo* e *in vivo* correspondentes são conhecidos ou podem ser facilmente determinados por aqueles versados na técnica. Qualquer pessoa versada na técnica pode usar um polinucleotídeo da invenção descrito aqui abaixo que codifica qualquer um dos polipeptídeos descritos acima ou os vetores correspondentes ao invés do material proteináceo em si.

Assim, aqueles versados na técnica apreciarão prontamente que o polipeptídeo da invenção pode ser usado para a construção de outros polipeptídeos de especificidade e função biológica desejadas. Espera-se que os polipeptídeos de invenção exerçam um papel terapêutico e científico importante em particular no campo médico, por exemplo, no desenvolvimento de novas abordagens de tratamento para distúrbios relacionados às células B, tal como determinadas formas de câncer e doenças auto-imunes ou como ferramentas interessantes para a análise e modulação das vias de transdução de sinal celular correspondentes.

Em uma outra concretização preferida da invenção, o referido pelo menos um outro domínio compreende uma molécula selecionado do grupo consistindo de moléculas efetadoras tendo uma conformação adequada para atividade biológica, seqüências de aminoácido capazes de capturar um íon e seqüências de aminoácido capazes de ligação seletiva a um suporte sólido ou a um antígeno pré-selecionado.

De preferência, o referido outro domínio compreende uma enzima, toxina, receptor, local de ligação, linfocina, citocina, hormônio, uma metade remotamente detectável, anti-metabólito, um átomo radioativo ou um

antígeno. O referido antígeno pode ser, por exemplo, um antígeno tumorigênico, um antígeno viral, um antígeno microbiano, um alérgeno, um auto-antígeno, um vírus, um microorganismo, um polipeptídeo, um peptídeo ou uma pluralidade de células tumorígenas. Além disso, a referida sequência
5 capaz de capturar um íon é, de preferência, selecionada de calmodulina, metalotioneína, um fragmento funcional das mesmas ou uma sequência de aminoácido rica em pelo menos um de ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina e arginina. Além disso, a referida sequência de polipeptídeo capaz de
10 ligação seletiva a um suporte sólido pode ser uma sequência de aminoácido positiva ou negativamente carregada, uma sequência de aminoácido contendo cisteína, avidina, estreptavidina, um fragmento funcional de proteína A de *Staphylococcus*, GST, um His-tag, um FLAG-tag ou Lex A. Conforme é descrito no Exemplos em anexo, o polipeptídeo da invenção exemplificado por um anticorpo com cadeia simples também foi expresso com um FLAG-
15 tag N-terminal e/ou His-tag C-terminal que permite purificação e detecção fácil. O FLAG-tag usado no exemplo compreende 8 aminoácidos (veja Figura 8) e é usado, assim, de preferência de acordo com a presente invenção. Contudo, FLAG-tags compreendidos de versões mais curtas do FLAG usado nos exemplos em anexo, tal como a sequência de aminoácido Asp-Tyr-
20 Lys-Asp, também são adequadas.

As moléculas efetadoras e seqüências de aminoácido descritas acima podem estar presentes em uma pró-forma a qual é, em si, ativa ou não e a qual pode ser removida quando, por exemplo, de entrada em um determinado ambiente celular.

25 Em uma concretização mais preferida da invenção, o referido receptor é uma molécula com superfície co-estimulatória importante para a ativação das células T ou compreende um local de ligação a epítopo ou um local de ligação a hormônio.

Em uma outra concretização mais preferida da invenção, a referida molécula com superfície co-estimulatória é CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-
30 2).

Ainda, em uma outra concretização, a presente invenção refere-

se a polinucleotídeos os quais, quando de expressão, codificam os polipeptídeos acima descritos. Os referidos polinucleotídeos podem ser fundidos a seqüências de controle de expressão adequadas conhecidas na técnica a fim de assegurar transcrição e tradução apropriadas do polipeptídeo.

- 5 O referido polinucleotídeo pode, por exemplo, ser DNA, cDNA, RNA ou DNA ou RNA sinteticamente produzidos ou uma molécula de ácido nucléico quimérica recombinantemente produzida compreendendo qualquer um desses polinucleotídeos, sozinhos ou em combinação. De preferência, o referido polinucleotídeo é parte de um vetor. Tais vetores podem compreender outros genes tais como genes identificadores os quais permitem a seleção do referido vetor em uma célula hospedeira adequada e sob condições adequadas. De preferência, o polinucleotídeo da invenção é operavelmente ligada a seqüências controladoras de expressão que permitem a expressão em células procariotas ou eucariotas. A expressão do referido polinucleotídeo compreende a transcrição do polinucleotídeo em um mRNA traduzível.
- 10 Elementos regulatórios que asseguram a expressão em células eucariotas, de preferência células de mamíferos, são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Eles usualmente compreendem seqüências regulatórias que asseguram o início da transcrição e opcionalmente sinais de poli-A que asseguram o término da transcrição e estabilização do transcrito. Elementos regulatórios adicionais podem incluir intensificadores transcrpcionais bem como traducionais e/ou regiões promotoras naturalmente associadas e/ou heterólogas. Elementos regulatórios possíveis que permitem a expressão em células hospedeiras procariotas compreendem, por exemplo, o promotor
- 15 PL, lac, trp ou tac em *E. coli* e exemplos de promotores que permitem a expressão em células hospedeiras eucariotas são o promotor AOX1 ou GAL1 em levedo ou o promotor de CMV, SV40, RSV (vírus do sarcoma de Rous), o intensificador de CMV, o intensificador de SV40 ou um íntron de globina em células de mamíferos e outros animais. Outros elementos os quais são
- 20 responsáveis pelo início da transcrição de tais elementos regulatórios também podem compreender sinais de término de transcrição, tal como o local SV40-poli-A ou o local tk-poli-A, a jusante do polinucleotídeo. Além disso,
- 25
- 30

dependendo do sistema de expressão usado, seqüências leitoras capazes de direcionar o polipeptídeo a um compartimento celular ou secretá-lo no meio, podem ser adicionadas à seqüência de codificação do polinucleotídeo da invenção e são bem conhecidas na técnica; veja também, por exemplo, os exemplos em anexo. A(s) seqüência(s) leitora(s) é(são) estruturada(s) em uma fase apropriada com seqüências de tradução, início e término e, de preferência, uma seqüência leitora capaz de direcionar a secreção da proteína traduzida ou uma parte da mesma, no espaço periplásmico ou meio extracelular. Opcionalmente, a seqüência heteróloga pode codificar uma proteína de fusão incluindo um peptídeo de identificação N-terminal que confere as características desejadas, por exemplo, estabilização ou purificação simplificada do produto recombinante expresso; veja supra. Nesse contexto, vetores de expressão adequados são conhecidos na técnica, tal como o vetor de expressão de cDNA de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitrogene) ou pSPORT1 (GIBCO BRL). De preferência, as seqüências controladoras de expressão serão sistemas promotores eucariotas em vetores capazes de transformação das células hospedeiras eucariotas transfectadas, mas seqüências controladoras para hospedeiros procariotas também podem ser usadas. Uma vez que o vetor tenha sido incorporado no hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para um elevado nível de expressão das seqüências de nucleotídeo e, conforme desejado, a coleta e purificação do polipeptídeo da invenção pode se seguir; veja, por exemplo, os exemplos em anexo.

Conforme descrito acima, o polinucleotídeo da invenção pode ser usado sozinho ou como parte de um vetor a fim de expressar o polipeptídeo da invenção em células, por exemplo, para terapia genética ou diagnóstico de doenças relacionadas a distúrbios das células B. Os polinucleotídeos ou vetores contendo a(s) seqüência(s) de DNA que codifica(m) qualquer um dos polipeptídeos acima descritos são introduzidos nas células as quais, por sua vez, produzem o polipeptídeo de interesse. A terapia genética, a qual é baseada sobre a introdução de genes terapêuticos em cé-

lulas através de técnicas *ex-vivo* ou *in-vivo*, é uma das aplicações mais importantes da transferência de gene. Vetores, métodos ou sistemas para distribuição de genes adequados para terapia genética *in-vitro* ou *in-vivo* são descritos na literatura e são conhecidos por aqueles versados na técnica; veja, por exemplo, Giordano, *Nature Medicine* 2 (1996), 534-539; Schaper, *Circ. Res.* 79 (1996), 911-919; Anderson, *Science* 256 (1992), 808-813; Verma, *Nature* 389 (1994), 239; Isner, *Lancet* 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, *Circ. Res.* 77 (1995), 1077-1086; Onodera, *Blood* 91 (1998), 30-36; Verma, *Gene Ther.* 5 (1998), 692-699; Nabel, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 811 (1997), 289-292; Verzeletti, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998), 2243-51; Wang, *Nature Medicine* 2 (1996), 714-716; WO 94/29469; WO 97/00957, US 5.580.859; US 5.589.466 ou Schaper, *Current Opinion in Biotechnology* 7 (1996), 635-640 e referências citadas no mesmo. Os polinucleotídeos e vetores da invenção podem ser projetados para introdução direta ou para introdução via lipossomas ou vetores virais (por exemplo, adenoviral, retroviral) na célula. De preferência, a referida célula é uma célula germinativa, uma célula embriônica ou uma célula do óvulo ou derivada do mesmo, mais preferivelmente a referida célula é uma célula do tronco. Um exemplo de uma célula do tronco embriônico pode ser, *inter alia*, uma célula do tronco conforme descrito em Nagy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 8424-8428.

De acordo com o acima, a presente invenção refere-se a vetores, particularmente plasmídeos, cosmídeos, vírus e bacteriófagos usados convencionalmente em engenharia genética que compreendem um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção. De preferência, o referido vetor é um vetor de expressão e/ou um vetor para objetivação ou transferência de gene. Vetores de expressão derivados de vírus tais como retrovírus, vírus da varíola bovina, vírus adeno-associado, vírus do herpes ou papiloma vírus bovino, podem ser usados para distribuição de polinucleotídeos ou vetor da invenção em populações de células alvo. Métodos os quais são conhecidos por aqueles versados na técnica podem ser usados para construir vetores recombinantes; veja, por exemplo, as técnicas des-

critas em Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. e Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Alternativamente, os polinucleotídeos e vetores da invenção podem ser re-

5 constituídos em lipossomas para distribuição às células alvo. Os vetores contendo os polinucleotídeos da invenção podem ser transferidos para a célula hospedeira por meio de métodos bem conhecidos, os quais variam dependendo do tipo de célula hospedeira. Por exemplo, transfecção por cloreto de cálcio é comumente utilizada para células procariotas, ao passo que

10 tratamento por fosfato de cálcio ou eletroporação pode ser usado para outras células hospedeiras; veja Sambrook, *supra*. Uma vez expressos, os polipeptídeos da presente invenção podem ser purificados de acordo com procedimentos padrões da técnica, incluindo precipitação de sulfato de amônio, colunas de afinidade, cromatografia em coluna, eletroforese em gel e se-

15 melhantes; veja Scopes, *"Protein Purification"*, Springer-Verlag, N.Y. (1982). Polipeptídeos substancialmente puros de pelo menos cerca de 90 a 95% de homogeneidade são preferidos e 98 a 99% ou mais de homogeneidade são mais preferidos para usos farmacêuticos. Uma vez purificados, parcialmente ou até a homogeneidade conforme desejado, os polipeptídeos podem, en-

20 tão, ser usados terapeuticamente (incluindo extra-corporalmente) ou no desenvolvimento e realização de procedimentos de ensaio.

Em uma outra concretização, a presente invenção refere-se a uma célula contendo o polinucleotídeo ou vetor descrito acima. De preferência, a referida célula é uma célula eucariota, mais preferivelmente de

25 mamífero, se usos terapêuticos do polipeptídeo são pretendidos. Naturalmente, células de levedo e procariotas menos preferidas, por exemplo, bacterianas, podem servir também, em particular se o polipeptídeo produzido é usado como um meio de diagnóstico. O polinucleotídeo ou vetor da invenção, o qual está presente na célula hospedeira, pode ser integrado no

30 genoma da célula hospedeira ou ele pode ser mantido extra-cromossomicamente.

O termo "procariota" se destina a incluir todas as bactérias as

quais podem ser transformadas ou transfectadas com moléculas de DNA ou RNA para a expressão de um polipeptídeo da invenção. Hospedeiros procariotas podem incluir bactérias gram negativas, bem como gram positivas tais como, por exemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*. O termo "eucariota" se destina a incluir células de levedo, vegetais superiores, insetos e de preferência mamíferos. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, os polipeptídeos da presente invenção podem ser glicosilados ou podem ser não-glicosilados. Os polipeptídeos da invenção também podem incluir um resí-

5 duo inicial do aminoácido metionina. Um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção pode ser usado para transformar ou transfectar o hospedeiro usando-se qualquer um dos métodos comumente conhecidos por aqueles versados na técnica. Especialmente preferido é o uso de um plasmídeo ou um vírus contendo a seqüência de codificação do polipeptídeo

10 da invenção e geneticamente fundido ao mesmo em um FLAG-tag N-terminal e/ou His-tag C-terminal. De preferência, o comprimento do referido FLAG-tag é de cerca de 4 a 8 aminoácidos, mais preferivelmente 8 aminoácidos. Métodos para o preparo de genes fundidos operavelmente ligados e expressão dos mesmos, por exemplo, em células de mamíferos e bactérias

15 são bem conhecidos na técnica (Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989). As estruturas genéticas e métodos descritos ali podem ser utilizados para expressão do polipeptídeo da invenção em hospedeiros eucariotas e procariotas. Em geral, vetores de expressão contendo seqüências promoto-

20 ras as quais facilitam a transcrição eficiente do polinucleotídeo inserido são usados junto com o hospedeiro. O vetor de expressão contém, tipicamente, uma origem de replicação, um promotor e um terminador, bem como genes específicos os quais são capazes de proporcionar seleção fenotípica das células transformadas. Além disso, animais transgênicos, de preferência

25 mamíferos, compreendendo células da invenção podem ser usados para a produção em larga escala do polipeptídeo da invenção.

30

Em uma outra concretização, a presente invenção refere-se,

assim, a um processo para o preparo de um polipeptídeo descrito acima compreendendo a cultura de uma célula da invenção sob condições adequadas para a expressão do polipeptídeo e isolamento do polipeptídeo da célula ou do meio de cultura. Os hospedeiros transformados podem ser desenvolvidos em fermentadores e cultivados de acordo com métodos conhecidos na técnica a fim de se obter desenvolvimento celular ótimo. O polipeptídeo da invenção pode, então, ser isolado do meio de desenvolvimento, lisatos celulares ou frações da membrana celular. O isolamento e purificação, por exemplo, dos polipeptídeos microbicamente expressos da invenção podem ser através de qualquer meio convencional tal como, por exemplo, separações cromatográficas preparativas e separações imunológicas tais como aquelas envolvendo o uso de anticorpos monoclonais e policlonais dirigidos, por exemplo, contra um marcador do polipeptídeo da invenção ou conforme descrito nos exemplos em anexo.

Assim, a presente invenção permite a produção recombinante de polipeptídeos compreendendo locais de ligação tendo afinidade e especificidade por um epítipo do antígeno CD19 e CD3, respectivamente e opcionalmente um outro domínio adicional. Como é evidente do precedente, a invenção proporciona uma grande família de polipeptídeos compreendendo tais locais de ligação para qualquer uso em abordagens terapêuticas e diagnósticas. Será evidente para aqueles versados na técnica que os polipeptídeos da invenção podem ser ainda acoplados a outras metades conforme descrito acima, por exemplo, para aplicações em objetivação e reprodução de droga. Tal acoplamento pode ser conduzido quimicamente após expressão dos polipeptídeos ao local de fixação ou o produto do acoplamento pode ser manipulado no polipeptídeo da invenção a nível de DNA. Os DNAs são, então, expressos em um sistema hospedeiro adequado e as proteínas expressas são coletadas e renaturadas, se necessário. Conforme descrito acima, os locais de ligação são, de preferência, derivados da região variável dos anticorpos. A esse respeito, a tecnologia por hibridoma possibilita a produção de linhas de células que secretam o anticorpo essencialmente qualquer substância desejada que produz uma resposta imune. O

RNA que codifica as cadeias leve e pesada da imunoglobulina pode, então, ser obtido do citoplasma do hibridoma. A porção da extremidade 5' do mRNA pode ser usada a fim de preparar cDNA a ser usado no método da presente invenção. O DNA que codifica os polipeptídeos da invenção pode, subseqüentemente, ser expresso em células, de preferência células de ma-
5 míferos.

Dependendo da célula hospedeira, técnicas de renaturação podem ser requeridas para se atingir a conformação apropriada. Se necessário, substituições em pontos buscando otimizar a ligação podem ser feitas
10 no DNA usando-se mutagênese convencional em cassete ou outra metodologia de manipulação de proteína, conforme é divulgado aqui. O preparo dos polipeptídeos da invenção também pode ser dependente do conhecimento da seqüência de aminoácido (ou seqüência de DNA ou RNA correspondente) das proteínas bioativas tais como enzimas, toxinas, fatores do desenvolvimento, fatores de diferenciação celular, receptores, anti-
15 metabólitos, hormônios ou várias citocinas ou linfocinas. Tais seqüências são relatadas na literatura e estão disponíveis através de bancos de dados computadorizados. Por exemplo, um polipeptídeo da invenção pode ser construído o qual consiste, por exemplo, no fragmento Fv com cadeia simples e a parte extracelular da proteína co-estimulatória humana CD80 (B7-1) conectada por um ligante (Gly4Ser1)¹. A proteína co-estimulatória CD80 pertence à super-família Ig. Ela é uma proteína pesadamente glicosilada de 262 aminoácidos. Uma descrição mais detalhada foi publicada por Freeman, J. Immunol. 143 (1989), 2714-2722. A expressão estável pode ser realizada,
20 por exemplo, em células-CHO deficientes de DHFR, conforme descrito por Kaufmann, Methods Enzymol. 185 (1990), 537-566. A proteína pode, então, ser purificada via seu His-marcado preso ao C-término através do uso de uma coluna de Ni-NTA (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995), 7021-7025).

30 Adicionalmente, a presente invenção proporciona composições compreendendo o polipeptídeo antes mencionado, o polinucleotídeo ou o vetor da invenção.

De preferência, a presente invenção refere-se a composições as quais são composições farmacêuticas compreendendo esse(s) polipeptídeo(s), polinucleotídeo(s) ou vetor(es) antes mencionado(s) da invenção.

A composição farmacêutica da presente invenção pode ainda
5 compreender um veículo farmacêuticamente aceitável. Exemplos de veículos farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões tal como emulsões óleo/água, vários tipos de agentes de umedecimento, soluções estéreis, etc. Composições compreendendo tais veículos podem ser formuladas através
10 de métodos convencionais bem conhecidos. Essas composições farmacêuticas podem ser administradas ao indivíduo em uma dose adequada. A administração das composições adequadas pode ser efetuada através de diferentes formas, por exemplo, através de administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. O regime de
15 dosagem será determinado pelo médico e fatores clínicos. Como é bem conhecido nas técnicas médicas, as dosagens de qualquer paciente depende de muitos fatores, incluindo tamanho do paciente, área da superfície corporal, idade, do composto em particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde em geral e outras drogas que são administradas
20 concorrentemente. Geralmente, o regime como uma administração regular da composição farmacêutica estará na faixa de unidades de 1 µg a 10 mg por dia. Se o regime é uma infusão contínua, ele também estará na faixa de unidades de 0,01 µg a 10 mg por quilograma de peso corporal por minuto, respectivamente. Contudo, uma dosagem mais preferida para infusão contí-
25 nua estaria na faixa de unidades de 0,01 µg a 10 mg por quilograma de peso corporal por hora. Dosagens particularmente preferidas são receitadas aqui abaixo. O progresso pode ser monitorado através de avaliação periódica. As dosagens variarão, mas uma dosagem preferida para administração intravenosa de DNA é de aproximadamente 10^6 a 10^{12} cópias da molécula
30 de DNA. As composições da invenção podem ser administradas local ou sistematicamente. A administração geralmente será parenteral, por exemplo, intravenosamente; o DNA também pode ser administrado diretamente ao

local alvo, por exemplo, através de distribuição biolística a um local alvo externo ou interno ou através de catéter a um local em uma artéria. Preparados para administração parenteral incluem soluções aquosas estéreis ou não-aquosas, suspensões e emulsões. Exemplos de solventes não-aquosos são propileno glicol, polietileno glicol, óleos vegetais tais como óleo de oliva e ésteres orgânicos injetáveis tais como oleato de etila. Veículos aquosos incluem água, soluções, emulsões ou suspensões alcóolicas/aquosas, incluindo solução salina e meios tamponados. Veículos parenterais incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactado ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluidos e nutrientes, reabastecedores de eletrólito (tais como aqueles baseados em dextrose de Ringer) e semelhantes. Conservantes e outros aditivos também podem estar presentes tais como, por exemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes de quelação e gases inertes e semelhantes. Além disso, a composição farmacêutica da presente invenção poderia compreender veículos proteináceos tais como, por exemplo, albumina de soro ou imunoglobulina, de preferência de origem humana. Além disso, é pretendido que a composição farmacêutica da invenção compreenda outros agentes biologicamente ativos, dependendo do uso pretendido da composição farmacêutica. Tais agentes poderiam ser drogas que atuam sobre o sistema gastrointestinal, drogas que atuam como citostática, drogas que impedem a hiperuremia e/ou agentes tais como moléculas co-estimulatórias de células T ou citocinas conhecidas na técnica.

É pretendido pela presente invenção que os vários polinucleotídeos e vetores da invenção sejam administrados sozinhos ou em qualquer combinação usando-se vetores e/ou sistemas de distribuição de genes padrões e opcionalmente junto com um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Subseqüente a administração, os referidos polinucleotídeos ou vetores podem ser estavelmente integrados no genoma do indivíduo.

Por outro lado, vetores virais podem ser usados, os quais são específicos para determinadas células ou tecidos e persistem nas referidas

células. Veículos e excipientes farmacêuticos adequados são bem conhecidos na técnica. As composições farmacêuticas preparadas de acordo com a invenção podem ser usadas para a prevenção ou tratamento ou retardo de diferentes tipos de doenças, as quais estão relacionadas a imunodeficiências e malignidades relacionadas às células B.

Além disso, é possível usar uma composição farmacêutica da invenção, a qual compreende um polinucleotídeo ou vetor da invenção, na terapia genética. Sistemas de distribuição de gene adequados podem incluir lipossomas, sistemas de distribuição mediados por receptores, DNA nu e vetores virais tais como vírus do herpes, retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados, dentre outros. A distribuição de ácidos nucleicos a um local específico do corpo para a terapia genética também pode ser realizada usando-se um sistema de distribuição biofísico, tal como aquele descrito por Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729). Outros métodos para a distribuição de ácidos nucleicos compreendem transferência de gene mediada por partículas, por exemplo, conforme descrito em Verma, Gene Ther. 15 (1998), 692-699. Deve ser compreendido que os polinucleotídeos e vetores introduzidos expressam o produto genético após introdução na referida célula e de preferência permanecem nesse estado durante a vida útil da referida célula. Por exemplo, linhas de células as quais expressam estavelmente o polinucleotídeo sob o controle de seqüências regulatórias apropriadas podem ser manipuladas de acordo com métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Ao invés de usar vetores de expressão os quais contêm origens virais de replicação, as células hospedeiras também podem ser transformadas com o polinucleotídeo da invenção e um identificador selecionável, sobre o mesmo ou sobre plasmídeos diferentes. Em seguida à introdução do DNA estranho, as células manipuladas podem ser deixadas desenvolver durante 1-2 dias em um meio enriquecido e, então, são transferidas para um meio seletivo. O identificador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite a seleção de células tendo integrado estavelmente o plasmídeo em seus cromossomas e se desenvolvem a fim de formar focos os quais, por sua vez, po-

dem ser clonados e expandidos em linhas de células. Tais linhas de células manipuladas também são particularmente úteis em métodos de seleção para a detecção de compostos envolvidos, por exemplo, na interação células B/células T.

5 Uma variedade de sistemas de seleção pode ser usado incluindo, mas não-limitado, a cinase de timidina do vírus do herpes simples (Wigler, Cell 11 (1977) 223), fosforibossiltransferase de hipoxantina-guanina (Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962) 2026) e fosforibossiltransferase de adenina (Lowy, Cell 22 (1980) 817) em células tk⁻, hgprt⁻ ou aprt⁻,
 10 respectivamente. Também, resistência anti-metabólito pode ser usada como a base de seleção para dhfr, o qual confere resistência ao metotrexato (Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 1527), gpt, o qual confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 2072); neo, o qual
 15 confere resistência ao minoglicosídeo G-418 (Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981) 1); higro, o qual confere resistência à higromicina (Santerre, Gene 30 (1984) 147); ou puromicina (pat, N-acetil transferase de puromicina). Genes selecionáveis adicionais têm sido descritos, por exemplo, trpB, o qual permite que as células utilizem indol em lugar de triptofano, hisD, o
 20 qual permite que as células utilizem histinol em lugar de histidina (Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 8047); e ODC (decarboxilase de ornitina), o qual confere resistência ao inibidor de decarboxilase de ornitina, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McCologue, 1987, em: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

25 Em outra concretização, a presente invenção refere-se a uma composição diagnóstica compreendendo qualquer um dos polipeptídeos, polinucleotídeos ou vetores acima descritos da invenção e opcionalmente meios adequados para detecção.

30 Os polipeptídeos da invenção também são adequados para uso em imuno-ensaios, nos quais eles podem ser utilizados em fase líquida ou ligados a um veículo em fase sólida. Exemplos de imuno-ensaios os quais podem utilizar o polipeptídeo da invenção são imuno-ensaios competitivos e

não-competitivos em um formato direto ou indireto. Exemplos de tais imunoenaios são o radio imuno ensaio (RIA), o ensaio em sanduíche (ensaio imunométrico) e por coloração de Western.

Os polipeptídeos da invenção podem ser ligados a muitos veículos diferentes e usados a fim de isolar células que se ligam especificamente aos referidos polipeptídeos. Exemplos de veículos bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, cloreto de polivinila, polipropileno, polietileno, policarbonato, dextrana, náilon, amiloses, celulosas naturais e modificadas, metais coloidais, poliacrilamidas, agaroses e magnetita. A natureza do veículo pode ser solúvel ou insolúvel para fins da invenção.

Existem muitos rótulos e métodos de rotulação diferentes conhecidos por aqueles versados na técnica. Exemplos dos tipos de rótulos os quais podem ser usados na presente invenção incluem enzimas, rádio-isótopos, metais coloidais, compostos fluorescentes, compostos quimio-luminescentes e compostos bio-luminescentes; veja também as concretizações discutidas aqui acima.

A presente invenção também refere-se ao uso de polipeptídeo, polinucleotídeo e vetor da invenção descritos aqui acima para o preparo de uma composição farmacêutica para o tratamento de malignidades das células B, doenças auto-imunes mediadas pelas células B ou depleção de células B.

Estudos clínicos recentes com atividade citotóxica re-objetivada das células T humanas por anticorpos biespecíficos têm mostrado resultados promissores no tratamento de doença de Hodgkin resistente (33), câncer de mama e ovário (34-37) e glioma maligno (38). Dado os fatos de que:

- os anticorpos bsc, devido a sua baixa massa molecular, facilitam a penetração em tumores (conforme foi mostrado com relação a fragmentos Fab ou Fv) (39); e

- os anticorpos bsc serem suspeitos de diminuir a toxicidade dose dependente e limitada pela dose causada pela liberação sistêmica de citocina mediada pelas partes Fc de anticorpos biespecíficos convencionais (40); e

- mesmo um anticorpo monoclonal intacto (dirigido contra CD20) levar à regressão do tumor em estágios avançados de NHL (41, 42), é esperado - e, na verdade, foi demonstrado - que os polipeptídeos da invenção são moléculas interessantes que contribuem para outros aperfeiçoamentos terapêuticos.

Assim, em uma concretização preferida, a composição farmacêutica da invenção é usada para o tratamento de linfoma não-Hodgkin.

As faixas de dosagem da administração dos polipeptídeos, polinucleotídeos e vetores da invenção são aquelas grandes o bastante para produzir o efeito desejado, nas quais os sintomas das doenças mediadas pelas células B são aliviados. A dosagem não será tão grande para causar efeitos colaterais adversos essenciais, tais como reações colaterais indesejadas, reações anafiláticas e semelhantes. Geralmente, a dosagem variará com a idade, condição, sexo e extensão da doença no paciente e pode ser determinada por aqueles versados na técnica. A dosagem pode ser ajustada pelo médico no caso de quaisquer contra-indicações. É pretendido que a faixa da referida dose seja ajustada, por exemplo, em 0,01 µg a 10 mg do polipeptídeo da invenção. Uma dosagem particularmente preferida é 0,1 µg a 1 mg, ainda mais preferido é 1 µg a 100 µg e mais preferida é uma dosagem de 3 µg a 10 µg conforme ilustrado, por exemplo, no exemplo 7 em anexo.

Além disso, a invenção refere-se a um método para identificação de compostos co-estimulatórios ou de ativação de células T ou para identificação de inibidores da ativação e estimulação das células T compreendendo:

(a) a cultura de células CD19 positivas (de preferência células B) e células T na presença do polipeptídeo da invenção e, opcionalmente, na presença de um componente capaz de proporcionar um sinal detectável em resposta à ativação das células T com um composto a ser selecionado sob condições que permitem a interação do composto com as células; e

(b) detecção da presença ou ausência de um sinal gerado a partir da interação do composto com as células.

Essa concretização é particularmente útil para a testagem da capacidade dos compostos como moléculas co-estimulatórias. Nesse método, a célula CD19 positiva/célula T proporciona um sinal primário de ativação para a célula T, assim, evitando o receptor clonotípico das células T.

5 Então, pode ser determinado, de acordo com a invenção, qual composto a ser testado ainda é necessário para ativar realmente as células T. No método da invenção, a célula CD19 positiva/célula T funciona como uma célula estimulatória que se liga a moléculas biespecíficas as quais são ligadas a complexos de CD3 sobre a superfície da mesma célula T. Os métodos bio-

10 lógicos para realização da cultura, detecção e, opcionalmente, testagem são claros para aqueles versados na técnica.

O termo "composto" no método da invenção inclui uma única substância ou uma pluralidade de substâncias as quais podem ou não ser idênticas. O(s) referido(s) composto(s) pode(m) estar compreendido, por

15 exemplo, em amostras, por exemplo, extratos de células de vegetais, animais ou microorganismos. Além disso, os referidos compostos podem ser conhecidos na técnica, mas também não conhecidos capazes de inibição da ativação das células T ou não conhecidos sendo úteis como um fator co-estimulatório das células T, respectivamente. A pluralidade de compostos

20 pode ser, por exemplo, adicionada ao meio de cultura ou injetada na célula.

Se uma amostra contendo (uns) composto(s) é identificada no método da invenção, então, é possível isolar o composto da amostra original identificada como contendo o composto em questão ou pode-se ainda subdividir a amostra original, por exemplo, se ela consiste em uma pluralidade

25 de compostos diferentes, de modo a reduzir o número de substâncias diferentes por amostra e repetir o método com as subdivisões da amostra original. Pode-se, então, determinar se a referida amostra ou composto mostra as propriedades desejadas por meio de métodos conhecidos na técnica, tal como descrito aqui e nos exemplos em anexo. Dependendo da complexida-

30 de das amostras, as etapas descritas acima podem ser realizadas muitas vezes, de preferência até que a amostra identificada de acordo com o método da invenção compreenda somente um número limitado de ou somente

uma substância. De preferência, a referida amostra compreende substâncias ou propriedades químicas e/ou físicas similares e mais preferivelmente as referidas substâncias são idênticas. Os métodos da presente invenção podem ser facilmente realizados e projetados por aqueles versados na técnica, por exemplo, de acordo com outros ensaios baseados em células descritos na técnica anterior ou através do uso e modificação dos métodos conforme descrito nos exemplos em anexo. Além disso, aqueles versados na técnica reconhecerão prontamente quais outros compostos e/ou células que podem ser usados de forma a realizar os métodos da invenção, por exemplo, interleucinas ou enzimas, se necessário, que convertem um determinado composto ao precursor o qual, por sua vez, estimula ou suprime a ativação das células T. Tal adaptação do método da invenção está bem dentro da capacidade daqueles versados na técnica e pode ser realizada sem a experimentação indevida.

Compostos os quais podem ser usados de acordo com o método da presente invenção incluem peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, anticorpos, compostos orgânicos pequenos, ligantes, peptideométicos, PNAs e semelhantes. Os referidos compostos também podem ser derivados funcionais ou análogos de ativadores ou inibidores conhecidos de células T. Métodos para o preparo de derivados e análogos químicos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e são descritos, por exemplo, em Beilstein, Handbook of Organic Chemistry, Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y. 10010 U.S.A. e Organic Synthesis, Wiley, New York, USA. Além disso, os referidos derivados e análogos podem ser testados com relação a seus efeitos de acordo com métodos conhecidos na técnica ou conforme descrito, por exemplo, nos exemplos em anexo. Além disso, peptideométicos e/ou o modelo projetado em computador de ativadores ou inibidores da ativação de células T apropriados podem ser usados, por exemplo, de acordo com os métodos descritos abaixo. Programas de computador apropriados podem ser usados para a identificação de locais interativos de um inibidor putativo e o antígeno da invenção por meio de buscas auxiliares em computador para motivos estruturais complementares

(Fassina, *Immunomethods* 5 (1994), 114-120). Outros sistemas de computador apropriados para o projeto auxiliado por computador de proteínas e peptídeos são descritos na técnica anterior, por exemplo, em Berry, *Biochem. Soc. Trans.* 22 (1994), 1033-1036; Wodak, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 501 (1987), 1-13; Pablo, *Biochemistry* 25 (1986), 5987-5991. Os resultados obtidos da análise por computador acima descrita podem ser usados em combinação com o método da invenção, por exemplo, para otimização de ativadores ou inibidores conhecidos das células T. Peptideométicos apropriados também podem ser identificados por meio de síntese de bibliotecas combinatoriais peptido-miméticas através de modificação química sucessiva e testagem dos compostos resultantes, por exemplo, de acordo com o método descrito aqui e nos exemplos em anexo. Métodos para a geração e uso de bibliotecas combinatoriais peptido-miméticas são descritos na técnica anterior, por exemplo, em Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234 e Dorner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715. Além disso, a estrutura tridimensional e/ou cristalográfica dos inibidores ou ativadores da interação células B/células T pode ser usada para o projeto de inibidores ou ativadores peptideométicos da ativação das células T a serem testados no método da invenção (Rose, *Biochemistry* 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 1545-1558).

Em resumo, a presente invenção proporciona métodos para identificação de compostos os quais são capazes de modular as respostas imunes mediadas por células B/células T. Verificou-se que os compostos que ativam as respostas mediadas por células B/células T podem ser usados no tratamento de câncer e doenças relacionadas. Além disso, também pode ser possível inibir especificamente doenças virais, dessa forma, impedindo a infecção viral ou disseminação viral. Compostos identificados como supressores da ativação ou estimulação das células T podem ser usados em transplante de órgãos a fim de evitar rejeição ao enxerto; veja também supra. Espera-se que os compostos identificados ou obtidos de acordo com o método da presente invenção, assim, sejam muito úteis em aplicações diagnósticas e em particular terapêuticas. Conseqüentemente, em uma ou-

tra concretização, a invenção refere-se a um método para a produção de uma composição farmacêutica compreendendo a formulação do composto identificado na etapa (b) dos métodos descritos acima da invenção em uma forma farmaceuticamente aceitável. Além disso, é pretendido que o referido

5 componente possa ser modificado por peptideométicos. Métodos para a geração e uso de bibliotecas combinatoriais peptido-miméticas são descritos na técnica anterior, por exemplo, Ostresh, *Methods in Enzymology* 267 (1996), 220-234, Dorner, *Bioorg. Med. Chem.* 4 (1996), 709-715, Beeley, *Trends Biotechnol.* 12 (1994), 213-216 ou al-Obeidi, *Mol. Biotech.* 9 (1998),

10 205-223.

Os compostos terapeuticamente úteis identificados de acordo com o método da invenção podem ser administrados a um paciente através de qualquer método apropriado para o composto em particular, por exemplo, oral, intravenosa, parenteral, transdérmica, transmucosalmente ou através

15 de cirurgia ou implante (por exemplo, com o composto estando na forma de uma matriz sólida ou semi-sólida biologicamente compatível e reabsorvível) em ou próximo ao local onde o efeito do composto é desejado. As doses terapêuticas são determinadas como sendo apropriadas por aqueles versados na técnica, veja supra.

20 Adicionalmente, a presente invenção proporciona um método para o tratamento de malignidades das células B, doenças auto-imunes mediadas por células B ou a depleção de células B e/ou a um método para o retardo de uma condição patológica a qual é causada por distúrbios das células B compreendendo a introdução do polipeptídeo, do polinucleotídeo

25 ou do vetor da invenção em um mamífero afetado pelas referidas malignidades, doença e/ou condição patológica. Além disso, é preferido que o referido mamífero seja um ser humano.

Essas e outras concretizações são divulgadas e abrangidas pela descrição e Exemplos da presente invenção. Outra literatura referente

30 a qualquer um dos anticorpos, métodos, usos e compostos a serem empregados de acordo com a presente invenção podem ser extraídos de bibliotecas e bancos de dados públicos, usando-se, por exemplo, dispositivos ele-

trônicos. Por exemplo, o bancos de dados público "Medicine" pode ser utilizado, o qual está disponível na Internet, por exemplo, sob o endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/medline.html>. Outros banco de dados e endereços, tais como <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.infobiogen.fr/>,
 5 <http://www.fmi.ch/biology/research...tools.html>, <http://www.tigr.org/> são conhecidos por aqueles versados na técnica e também podem ser obtidos usando-se, por exemplo, <http://www.lycos.com>. Uma revisão da informação publicada em biotecnologia e uma visão de fontes relevantes da informação publicada útil na pesquisa retrospectiva e para informação atual é fornecida
 10 em Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

As Figuras mostram:

Figura 1:

SDS-Page: Coloração de coomassie do fragmento bscCD19xCD3 purificado com diferentes quantidades de proteínas. A massa
 15 molecular (kDa) do identificador é indicada à esquerda.

Figura 2:

Análise por FACS com o bscCD19xCD3 (200 µg/ml) sobre diferentes linhas de células B CD19-positivas (BJAB, SKW6.4, Blin-1, Daudi, Raji), sobre a linha de células B CD19-negativa BL60 e sobre células de
 20 Jurkat CD3-positivas e PBMCs humanas primárias. As linhas rompidas indicam controles negativos.

Figura 3:

Citotoxicidade do bscCD19xCD3 em um ensaio de liberação de
 25 ⁵¹Cr com PBMCs humanas não-estimuladas e diferentes linhas de células B. Efetuador: proporção de células alvo a 10:1, tempo de incubação de 4 horas. O desvio padrão em todas as três vezes estava abaixo de 7%.

Figura 4:

Ensaio de citotoxicidade por liberação de cromo com PBLs humano não-estimulado contra as linhas de células de plasmacitoma L363 e
 30 NCI e a linha de células de linfoma Daudi em uma proporção E:T de 20:1, tempo de incubação de 8 horas.

Figura 5:

Inibição da citotoxicidade de bscCD19xCD3 pelo anticorpo anti-CD19 original HD37 em um ensaio de liberação de cromo; tempo de incubação de 8 horas; proporção E:T de 20:1; concentração de bscCD19xCD3 de 1 ng/ml.

Figura 6:

Ensaio de citotoxicidade com PBMCs não-estimuladas contra células Daudi após adição de quantidades crescentes de EGTA; proporção E:T de 10:1; tempo de incubação de 4 horas.

Figura 7:

Citotoxicidade de bscCD19xCD3 em um ensaio de liberação de ^{51}Cr com PBMCs humanas não-estimuladas e Blin-1 como células alvo em diferentes proporções E:T; tempo de incubação de 4 horas; concentração do anticorpo biespecífico convencional de 3 $\mu\text{g/ml}$; concentração de bsc 17-1AxCD3 de 100 ng/ml; proporções E:T conforme indicado.

Figura 8:

Seqüência de DNA e da proteína do anticorpo bscCD19xCD3 (FLAG-marcado contendo variante). Os números indicam as posições dos nucleotídeos (nt), a seqüência de aminoácido correspondente é representada abaixo da seqüência de nucleotídeo. A seqüência de codificação de DNA para o anticorpo biespecífico começa na posição 1 e termina na posição 1593. Os primeiros seis nt (posição -10 a -5) e os últimos seis nt (posição 1596 a 1601) contêm os locais de clivagem da enzima de restrição para EcoRI e Sall, respectivamente. Os nucleotídeos 1 a 57 especificam a seqüência leitora; os nucleotídeos 82 a 414 e 460 a 831 codificam $V_L\text{CD19}$ e $V_H\text{CD19}$, respectivamente; os nucleotídeos 847 a 1203 e 1258 a 1575 codificam $V_H\text{CD3}$ e $V_L\text{CD3}$, respectivamente; e os nucleotídeos 1576 a 1593 codificam um His-marcado.

Figura 9:

Depleção de células B CD19^+ primárias (malignas) através de recrutamento de linfócitos T primários autólogos por meio do bscCD19xCD3.

A) Ponto de início ($t = 0$): $n = 3 \times 10^6$ PBL/cavidade foram culti-

vados em uma lâmina para cultura tecidual com 24 cavidades em um volume de 1 ml de meio RPMI 1640 em cada uma, suplementado com 10% de FCS cada uma. A percentagem inicial de células B CD19⁺ bem como aquela de células T CD4⁺ e CD8⁺ é indicada.

- 5 B-G) Relaciona as contagens de células T e B CD4⁺ e CD8⁺ após t = 5 dias de incubação a 37 °C/5% de CO₂ na ausência (B-C) ou presença (D-G) de bscCD19xCD3 (concentrações conforme indicado) com ou sem 60 U/ml de IL-2. Os controles negativos continham anticorpo biespecífico de cadeia simples (17-1AxCD3) com especificidade irrelevante pela célula alvo ou nenhum anticorpo biespecífico como um todo (C).

Figura 10:

Etapas de purificação para bscCD19xCD3

Figura 11:

- 15 Análise por SDS-PAGE com relação à pureza do bscCD19xCD3. Um gel coloidal de poliacrilamida com um gradiente de SDS de 4-12% corado com azul de coomassie é mostrado. Colunas 1 e 6, identificadores de tamanho molecular; coluna 2, sobrenadante da cultura de células; coluna 3, fração ativa a partir de cromatografia por troca de cátions; coluna 4, fração ativa a partir de cromatografia por afinidade a quelato de cobalto; coluna 5, fração ativa a partir de filtração em gel. Quantidades iguais de proteína (2 µg) do sobrenadante da cultura de células e as várias frações da coluna foram analisadas. O tamanho em kDa dos desvios de peso molecular é indicado à direita. A seta mostra a posição do bscCD19xCD3.

- 25 **Figura 12:**

- 30 Cromatografia por troca de cátions do bscCD19xCD3. A concentração de proteína foi medida através de absorção a 280 nm (mAU, esquerda). O perfil de eluição da proteína é mostrado pela linha sólida. O perfil de gradiente da etapa de NaCl é mostrado pela linha sólida reta (% de B, à direita) e as frações coletadas são indicadas pelas linhas rompidas. O bscCD19xCD3 foi detectado na fração F6.

Figura 13:

Cromatografia por afinidade a quelato de cobalto do bscCD19xCD3. A concentração de proteína foi medida através de absorção a 280 nm (mAU, esquerda). O perfil de eluição da proteína é mostrado pela linha sólida. O gradiente de imidazol é mostrado pela linha sólida reta (% de B, à direita) e as frações coletadas são indicadas pelas linhas rompidas. O bscCD19xCD3 foi detectado na fração F7.

Figura 14:

Filtração em gel de anti-CD19xanti-CD3. A concentração de proteína foi medida através de absorção a 280 nm (mAU, esquerda). O perfil de eluição da proteína é mostrado pela linha sólida. As linhas rompidas indicam as frações coletadas. O bscCD19xCD3 foi encontrado na fração F7, correspondendo a um tamanho molecular de aproximadamente 60 kDa.

Figura 15:

Níveis no sangue de gama-glutamil transferase (GGT) em resposta a tratamentos com bscCD19xCD3. Os níveis de GGT foram determinados através de um método bioquímico clínico padrão e são expressos como unidade/l. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro tratamento com a droga e, começando com zero, horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As setas indicam os pontos de tempo de administração da droga.

Figura 16:

Medições ultra-sônicas do baço do paciente A-B.

A: Determinação do tamanho do baço datada de 12 de Abril de 1999 antes da terapia com o bscCD19xCD3. A figura mostra o baço aumentado (tamanho de 146 mm x 69,2 mm), o que é devido à infiltração com células B malignas.

B: Determinação do tamanho do baço datada de 16 de Abril de 1999 após tratamento com 3 µg em 14 de Abril, seguido por 10 µg em 15 de Abril. A figura demonstra retração do baço para um tamanho de 132 mm x 58,9 mm causada pelo tratamento sistêmico com bscCD19xCD3. As discrepâncias das medições únicas aos valores de tamanho representados na Tabela 1 são explicados através de determinação do tamanho do órgão ba-

seadas em ultra som em diferentes planos espaciais. As duas dimensões são marcadas por (+) e (X).

Figura 17:

Contagem de leucócitos no sangue em resposta a tratamentos com bscCD19xCD3. O número de leucócitos é fornecido como partes Gi-ga/litro. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro trata-
5 mento com a droga e, começando com zero, horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As setas indicam os pontos de tempo de administração da droga.

10 **Figura 18:**

Níveis no sangue de proteína C reativa (CRP) em resposta a tratamentos com bscCD19xCD3. Os níveis de CRP foram determinados através de um método bioquímico clínico padrão e são expressos como mg/dl. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro tratamento
15 com droga e, começando com zero, horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As setas indicam os pontos de tempo de administração de droga.

Figura 19:

Níveis no sangue do fator-alfa de necrose de tumor (TNF) em resposta a tratamentos com bscCD19xCD3. Os níveis de TNF foram deter-
20 minados através de ELISA e são expressos como ng/ml. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro tratamento com a droga e, come-çando de zero, horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As se-
tas indicam os pontos de tempo de administração de droga.

25 **Figura 20:**

Níveis no sangue de interleucina-6 (IL-6) em resposta a trata-mentos com bscCD19xCD3. Os níveis de IL-6 foram determinados através de ELISA e são expressos como pg/ml. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro tratamento com a droga e, começando de zero,
30 horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As setas indicam os pontos de tempo de administração de droga.

Figura 21:

Níveis no sangue de interleucina-8 (IL-8) em resposta a tratamentos com bscCD19xCD3. Os níveis de IL-8 foram determinados através de ELISA e são expressos como pg/ml. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro tratamento com a droga e, começando de zero, horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As setas indicam os pontos de tempo de administração de droga.

Figura 22:

Níveis no sangue do receptor de interleucina-2 com cadeia alfa (IL-2R) em resposta a tratamentos com bscCD19xCD3. Os níveis de IL-2R foram determinados através de ELISA e são expressos como Unidades/ml. O eixo do tempo mostra dias (d) após o início do primeiro tratamento com a droga e, começando de zero, horas (h) em seguida a adições individuais de droga. As setas indicam os pontos de tempo de administração de droga.

A invenção será agora descrita através de referência aos exemplos biológicos a seguir os quais são meramente ilustrativos e não devem ser construídos como uma limitação do escopo da presente invenção.

Exemplo 1: Clonagem de Domínios Variáveis (V) de Imunoglobulina

Os domínios da cadeia leve V (VL) e da cadeia pesada (VH) do hibridoma HD37 (22) foram clonados de acordo com métodos padrão de PCR (23). A síntese de cDNA foi realizada com os primers oligo dT e polimerase Taq.

Lista de Primers

5'L1:

GAAGCACGCGTAGATATCKTGMTSACCCAAWCTCCA [SEQ ID NO: 1]

3'K:

GAAGATGGATCCAGCGGCCGCGCAGCATCAGC [SEQ ID NO:2]

5'H1:

CAGCCGGCCATGGCGCAGGTSCAGCTGCAGSAG [SEQ ID NO: 3]

3'G:

ACCAGGGGCCAGTGGATAGACAAGCTTGGGTGTCGTTTT [SEQ ID NO: 4]

5'VLB5RRV:

AGGTGTACACTCCATATCCAGCTGACCCAGTCTCCA [SEQ ID NO: 5]

3'VLGS15:

GGAGCCGCCGCCGCGCCAGAACCACCACCTTTGATCTCGAGCTTGGTCCC [SEQ ID NO: 6]

5'VHGS15:

GGCGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGTTCTCAGGTSMARCTGCAGSAGTCWG
G [SEQ ID NO: 7]

3'VHBspEI:

AATCCGGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG [SEQ ID NO: 8]

Para a amplificação dos domínios V via PCR nós usamos os primers 5'L1 e 3'K que flanqueiam o domínio V_L e 5'H1 e 3'G para a cadeia pesada baseado nos primers descritos por Dübel e outros (24).

- 5 O cDNA do fragmento scFv anti-CD3 foi gentilmente fornecido por A. Traunecker (25).

Exemplo 2: Construção de Fragmentos Biespecíficos com Cadeia Simples e Expressão Eucariota

- A fim de se obter um fragmento scFv anti-CD19, as regiões VL e
- 10 VH correspondentes clonadas em vetores de plasmídeo distintos serviram como modelos para uma PCR VL- e VH-específica usando-se os pares de primeiro de oligonucleotídeo 5'VLB5RRV/3'VLGS15 e 5'VHGS15/3'VHBspEI, respectivamente. Dessa forma, seqüências com sobreposições complementares foram introduzidas nos produtos de PCR, que se combinam a fim
- 15 de formar a seqüência de codificação do ligante (Gly₄Ser₁)₃ com 5 aminoácidos durante a fusão subsequente por PCR. Essa etapa de amplificação foi realizada com o par de primeiro 5'VLB5RRV/3'VHBspEI e o produto resultante da fusão (ou antes o fragmento scFV anti-CD19) foi clivado com as enzimas de restrição EcoRV e BspEI e, assim, clonado no vetor bluescript
- 20 KS (Stratagene) contendo ou a seqüência de codificação (EcoRI/Sall-clonada) do anticorpo biespecífico com cadeia simples anti-17-1A/anti-CD3 com um FLAG-tag N-terminal [1] ou aquela da versão modificada sem FLAG/epítipo (21), dessa forma, substituindo a anti-17-1A-especificidade pela anti-CD19 e preservando-se o ligante (Gly₄Ser₁)₃ com 5 aminoácidos
- 25 que conecta o fragmento scFv anti-CD3 C-terminal, respectivamente. Subseqüentemente, os fragmentos de DNA que codificam ambas as versões do

anticorpo biespecífico de cadeia simples anti-CD19/anti-CD3 com a estrutura de domínio VL_{CD19}-VH_{CD19}-VH_{CD3}-VL_{CD3} foram subclonados por EcoRI/SalI no vetor de expressão pEF-DHRF descrito [1], respectivamente. Os DNAs de plasmídeo resultantes foram transfectados em células CHO deficientes de DHFR através de eletroporação: a seleção, amplificação de gene e produção de proteína foram realizadas conforme descrito [1]. Nos exemplos a seguir, os resultados obtidos com a versão do bscCD19xCD3 contendo FLAG são ilustrados.

A purificação do bscCD19xCD3 do sobrenadante de células CHO transfectadas proporcionou 4 mg/litro de sobrenadante da cultura. O bsc-Ab foi purificado via sua cauda de histidina C-terminal através de cromatografia por afinidade sobre uma coluna Ni-NTA, conforme descrito [1]. O bsc-Ab foi eluído da coluna Ni-NTA como um pico distinto em uma concentração de imidazola a 200 mM. SDS-Page foi realizada de acordo com Laemmli (26) com um gel a 12% seguido por coloração com azul brilhante Coomassie R250 para análise da purificação do bsc-Ab. Os resultados da análise por SDS-Page (Fig. 1) mostram o tamanho esperado do bsc-Ab (60 kDa).

Exemplo 3: Propriedades de Ligação do bsc-AbCD19xCD3

As especificidades de ligação do bsc-Ab a CD3 e CD19 foram mostradas através de análise citométrica de fluxo sobre células de Jurkat CD3-positivas, PBMCs humanas e um número de diferentes linhas de células de linfoma de células B CD19-positivas Daudi, Raji, BJAB (linfoma de Burkitt), SKW6.4 (células B transformadas com EBV humano) e Blin-1 (linha de pré-células B) foram usados na análise citométrica de fluxo e ensaios de liberação de cromo. Jurkat é uma linha de células T CD3-positiva; BL60 e as linhas de células de plasmacitoma NCI e L363 são negativas para ambas as moléculas superficiais, CD3 e CD19. As linhas de células foram cultivadas em RPMI 1640 completo (Biochrom) com 10% de FCS (GIBCO).

1 x 10⁶ células foram lavadas com PBS, re-suspensas em 200 µl de PBS com 10% de Vernimmun (Centeon, Marburg, Alemanha) e 0,1% de NaN₃ e incubadas durante 30 minutos a 4 °C. Após uma etapa de centrifu-

gação (100 x g, 5 minutos), as células foram incubadas em 50 µl de bscCD19xCD3 (200 µg/ml em PBS com 10% de Venimmun e 0,1% de NaN₃) durante 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes com PBS. Para a detecção do bsc-Ab, um anticorpo FITC-conjugado contra o His-tag (Dianova) foi usado. O bsc-Ab 17-1AxCD3 irrelevante, produzido pelo mesmo sistema de expressão que o bscCD19xCD3 ou o anticorpo His-Tag sozinho, serviu como controles negativos. Citometria de fluxo foi realizada com um FACScan Becton Dickinson. Nenhuma ligação era detectável em células BL60, as quais não expressam nem o CD19 nem o CD3 (Fig. 2).

10 **Exemplo 4: Atividade Citotóxica do bsc-ABCD19xCD3 contra Células de Linfoma CD19-Positivas**

O anticorpo bscCD19xCD3 provou ser altamente citotóxico para muitas linhas de células de linfoma em um ensaio de liberação de ⁵¹Cr (Figura 3). Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) como células efetadoras foram isoladas de coágulos de doadores aleatórios usando-se centrifugação com um gradiente Lymphoprep™ (Nycomed) com etapas subseqüentes de centrifugação a 100 x g a fim de remover os trombócitos. Células B CD19-positivas foram depletadas usando-se Dynabeads® M-450 para CD19 (Dyna-
15 beads® M-450 para CD19 (Dyna). As populações de células depletadas foram analisadas por meio de citometria de fluxo (Becton Dickinson), a qual mostrou uma depleção de 99% de células CD19-positivas. As PBMCs foram incubadas durante a noite a 37 °C, 5% de CO₂. Linhas de células B CD19-positivas (Raji, Blin I, Daudi, BJAB, SKW6.4) foram usadas como células alvo. A citotoxicidade foi medida em um ensaio padrão de liberação de cromo em lâminas de 96 cavidades com fundo redondo (Nunc) usando-se meio RPMI 1640 completo (Biochrom) com 10% de FCS (GIBCO).
20
25

PBMCs não-estimuladas foram adicionadas em um volume de 80 µl de meio para cada cavidade contendo 20 µl de bsc-Ab em diferentes concentrações. Então, 100 µl de células alvo ⁵¹Cr-rotuladas (1 x 10⁴) foram
30 adicionados, as lâminas foram centrifugadas durante 3 minutos a 100 x g e incubadas durante 4 horas a 37 °C, 5% de CO₂. Após uma etapa adicional de centrifugação, 50 µl de sobrenadante foram removidos e analisados com

relação ao ^{51}Cr liberado em um contador gama (TopCount, Canberra Packard).

A liberação espontânea foi medida através de incubação das células alvo sem células efetadoras ou anticorpos e a liberação máxima foi determinada através de incubação das células alvo com 10% de Triton X-100. A incubação das células alvo com bscAb sem células efetadoras não resultou em lise mensurável. O percentual de lise específica foi calculado como liberação específica (%) = $[(\text{cpm, liberação experimental}) - (\text{cpm, liberação espontânea})] / [(\text{cpm, liberação máxima}) - (\text{cpm, liberação espontânea})] \times 100$. Todos os testes foram realizados três vezes. O SD dentro das três réplicas estava, em todos os experimentos, abaixo de 6%. A fim de se aproximar das condições *in vivo*, nós usamos PBMCs não-estimuladas de doadores saudáveis como células efetadoras. A indução rápida de citotoxicidade dentro de 4 horas pôde ser observada sem qualquer protocolo de pré-estimulação de células T. Como um controle, um anticorpo-bsc com diferente especificidade tumorigênica (bsc17-1AxCD3), mas gerado pelo mesmo sistema que o anticorpo bscCD19xCD3, mostrou atividade de lise não-significativamente acima da base média. Além disso, nenhuma atividade citotóxica pôde ser observada usando-se as linhas de células de plasmacitoma NCI e L363, as quais não expressam o CD19 como células alvo (Figura 4). Em ensaios competitivos usando-se quantidades crescentes do anticorpo monoclonal original CD19-específico HD37, a atividade citotóxica do bscCD19xCD3 pôde ser quase que completamente bloqueada (Figura 5). Esses controles mostram que os efeitos citotóxicos mediados pelo bscCD19xCD3 são antígeno-específicos. A fim de se obter mais informação acerca dos mecanismos moleculares sobre como o anticorpo bscCD19xCD3 mata as células alvo CD19-positivas, nós tentamos bloquear a citotoxicidade mediada pelo bscCD19xCD3 através do EGTA. Conforme mostrado na Figura 6, a atividade citotóxica do bscCD19xCD3 pôde ser completamente bloqueada por EGTA, indicando que a lise específica é um efeito mediado pelas células T (provavelmente através da via de perforina) ao invés de um efeito direto (por exemplo, de indução de apoptose) do anticorpo em si.

Usando-se células T não-estimuladas, mesmo em concentrações de anticorpo abaixo de 1 ng/ml, um efeito citotóxico significativo contra células BLIN-1 pôde ser observado (Figura 7). Mesmo em proporções E:T relativamente baixas (5:1, 2,5:1) e em concentrações muito baixas de anticorpo de 10-100 pg/ml, o anticorpo bscCD19xCD3 pôde induzir rapidamente uma atividade citotóxica das células T não-estimuladas (Figura 7). Em contraste, um anticorpo CD19xCD3 biespecífico convencional gerado através da técnica de hibridoma-híbrido (5-7, 27), não mostrou atividade citotóxica significativa sob essas condições mesmo em concentrações de até 3000 ng/ml (Figura 7). Esse anticorpo biespecífico convencional requereu pré-estimulação adicional das células T e elevadas concentrações de anticorpo de cerca de 100 ng/ml para induzir citotoxicidade específica das células T (não-mostrada), a qual é consistente com a literatura (5-7, 27).

Exemplo 5: Depleção de Células B Primárias (Malignas) Através de Células T Autólogas Por Meio da Atividade Citotóxica do bscCD19xCD3

De forma a avaliar a atividade citotóxica do bscCD19xCD3 sobre células B malignas primárias, células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) de um paciente sofrendo de B-CLL (leucemia linfática crônica derivada de células B) foram isoladas por meio de centrifugação em um gradiente com densidade de Ficoll. Essas células foram consecutivamente cultivadas na presença ou ausência de bscCD19xCD3 durante 5 dias a 37 °C/5% de CO₂ em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de FCS e, opcionalmente, com 60 U/ml de IL-2. Análise fluxocitométrica revelou que os linfócitos do sangue periférico (PBL) desse paciente com NHL (linfoma não-Hodgkin) em particular (que foi depois sistemicamente tratado com bscCD19xCD3; veja exemplo 7) continham 92,6% de células B CD19-positivas (= células alvo) e 7,4% de linfócitos T CD3-positivos (= células efetadoras) em uma proporção de células T CD4/CD8 de 2,6:4,8. A grande maioria dessas células B CD19-positivas consistia em células malignas. 3 x 10⁶ PBL/ml por cavidade foram cultivados em um volume de 1 ml em cada uma em uma lâmina para cultura tecidual de 24 cavidades. Como controles negativos, serviram meio de cultura mais IL-2 e meio de cultura mais IL-2

com o anticorpo biespecífico de cadeia simples irrelevante bsc17-A1xCD3 (1) em uma concentração de 0,5 µg/ml. Conforme mostrado na Fig. 9, nenhuma depleção de células CD19-positivas era detectável sob essas condições após 5 dias de incubação. Contudo, quando o bscCD19xCD3 foi adicionado em concentrações de 0,5 µg/ml ou 0,05 µg/ml (na presença ou ausência de IL-2), quase todas as células B CD19-positivas tinham sido mortas. As células cultivadas naquele momento consistiam principalmente em linfócitos T com uma proporção de células T CD4/CD8 de aproximadamente 1:2 a 1:3. Isso demonstra a excepcional citotoxicidade do bscCD19xCD3 contra células B CD19-positivas, uma vez que a depleção total de células B primárias por células T autólogas pôde ser induzida em uma concentração de apenas 50 ng/ml em uma proporção inicial desfavorável de células alvo efetadoras de menos do que 1:10, mesmo sem IL-2 ou outro tipo de estímulo adicional das células T.

15 **Exemplo 6: Purificação de bscCD19xCD3 para Uso Terapêutico**

bscCD19xCD3 foi produzido em células do ovário de Hamster Chinês (CHO) estavelmente transfectadas com um vetor de expressão (pEF-DHFR; veja exemplo 2) que codifica o bscCD19xCD3 e, adicionalmente, uma hexahistidina e FLAG tag. As células foram desenvolvidas em meio isento de soro (Rencyte) em um reator de fibra oca (Unisyn). Quinhentos ml de sobrenadante da cultura de células foram coletados e filtrados estéreis através de um filtro de 0,2 µm (AcroCap; Pall Gelman).

O bscCD19xCD3 foi detectado e quantificado através de coloração de Western usando-se IgG anti-FLAG de camundongo (Sigma) e IgG de bezerro-anti-camundongo acoplado a Fosfatase Alcalina (Sigma). A detecção foi realizada através de quimio-luminescência usando-se o sistema BCIP/NBT (Devitron). As concentrações de proteína foram determinadas por meio do ensaio de Bradford (Biorad), usando-se IgG bovina (Biorad) como proteína padrão. A pureza das frações da coluna foi analisada através de redução por eletroforese em gel (PAGE) com um gradiente de Bis/Tris poli-
acrilamida de 4-12% com dodecil sulfato de sódio (SDS) empregando-se um sistema tampão MOPS (Novex).

A purificação do bscCD19xCD3 até a homogeneidade requereu cromatografia por troca de cátions, cromatografia por afinidade a quelato de cobalto e, como etapa final, filtração em gel. Essas etapas de purificação foram realizadas empregando-se protocolos padrões (veja abaixo). Um fluxograma do procedimento de purificação é mostrado na Figura 10.

Cromatografia por troca de cátions: O sobrenadante da cultura de células das células CHO foi misturado com dois volumes de Tampão C (ácido morfolinoetano sulfônico a 30 mM [MES], NaCl a 20 mM, EDTA a 3 mM, hidrocloreto de benzamidina a 0,3 mM, pH de 5,5) e passado sobre uma coluna de troca de cátions SP Sepharose Fast Flow de 70 ml (Pharmacia) em uma taxa de fluxo de 20 ml/min. A coluna foi equilibrada com Tampão A (MES a 20 mM, NaCl a 20 mM, pH de 5,8). Após lavagem com 5 volumes de coluna de Tampão A, bscCD19xCD3 foi eluído com um gradiente de etapa de 45% de Tampão B (MES a 20 mM, NaCl a 1 mM, pH de 5,8) em Tampão A. O eluato recebeu 0,045 volumes de Tris/HCl a 1 M, pH de 8,5, contendo imidazol a 47 mM e foi subsequenteemente filtrado estéril (0,2 µm; AcroCap). Um perfil típico de eluição da cromatografia por troca de cátions é mostrado na Figura 12. O bscCD19xCD3 estava contido na fração 6.

Purificação por afinidade ao quelato de cobalto: O eluato da coluna de troca de cátions foi passado em uma taxa de fluxo de 2,5 ml/min. sobre uma coluna Chelating Sepharose Fast Flow de 10 ml (Pharmacia) equilibrada em Tampão AO (Na₂HPO₄ a 50 mM, NaCl a 400 mM, pH de 8,0). A coluna tinha sido pré-equilibrada com uma solução de cloreto de cobalto a 0,1 M. Após lavagem com 33 volumes de coluna com Tampão AO, o Tampão A (Na₂HPO₄ a 50 mM, NaCl a 400 mM, imidazol a 2 mM, pH de 6,4) e um gradiente de Tampão B a 0-12% (Na₂HPO₄ a 50 mM, NaCl a 400 mM, imidazol a 500 mM, pH de 6,4) em Tampão A, o bscCD19xCD3 foi eluído em uma etapa através de 30 ml de Tampão B a 100%. O eluato foi filtrado estéril, seguido por uma concentração de aproximadamente 10 vezes em um dispositivo MacroSep (Pall Gelman; corte de 10 kD). Um perfil típico de eluição com relação à cromatografia por afinidade a quelato de cobalto é mostrado na Figura 13. O bscCD19xCD3 foi detectado na fração No. 7.

Filtração em gel: O eluato concentrado da coluna de afinidade a quelato de cobalto foi carregado em uma taxa de fluxo de 0,75 ml/min. sobre uma coluna High Load Superdex 200 de 124 ml (Pharmacia; grau de preparação) equilibrada com solução salina tamponada com fosfato (Gibco).

- 5 O bscCD19xCD3 eluiu em uma fração com um tamanho molecular correspondendo a aproximadamente 55 kDa (Figura 14, fração No. 7). A fração da filtração em gel contendo o bscCD19xCD3 foi suplementada com 5% de albumina de soro humano (Behring), seguido por filtração estéril através de um filtro de 0,1 µm (Millex; Millipore).

- 10 A abundância de bscCD19xCD3 no sobrenadante da cultura de células e as várias frações ativas nas colunas, conforme analisado por SDS-PAGE, são mostradas na Figura 11. O bscCD19xCD3 era a principal banda de proteína detectada nos sobrenadantes da cultura de células (coluna 2). Anti-CD19xanti-CD3 altamente purificado, o qual foi usado para terapia humana, não mostrou impurezas detectáveis (Fig. 11, coluna 5).

Exemplo 7: Uso Clínico de bscCD19xCD3 em um Paciente com Linfoma das Células B

- Em um uso compassivo, um paciente (A-B, feminino, nascido em 1937) sofrendo de leucemia linfática crônica derivadas de células B (B-CLL) foi tratado com o anticorpo biespecífico de cadeia simples bscCD19xCD3.

História e Anamnese do Paciente:

- A paciente tinha sido diagnosticada com B-CLL em 1992. No momento da diagnose inicial, a doença tinha afetado várias regiões do nódulo linfático e o baço; além disso, anemia hemolítica de origem auto-imune e uma deficiência de imunoglobulina foram observadas. A paciente tem um estruma nodosa a qual é bem controlado e em condição eutireótica através de tratamento com 2,5 mg/d de carbimazol.

- A paciente tinha recebido ciclos múltiplos de quimioterapia com clorambucil e prednisona de 1992 até 1994. Em seguida à progressão da doença, o tratamento foi alterado para ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona (CHOP, 8 ciclos) e uma remissão foi obtida durante mais de um ano. Após uma nova reincidência, a paciente recebeu outros 6 ciclos

de CHOP, seguido por clorambucil e prednisona e um curso único de clorambucil apenas o que não causou qualquer melhora na doença. Em dezembro de 1998, irradiação do baço foi realizada a fim de controlar o progresso da esplenomegalia da paciente. A paciente experimentou uma depressão profunda da medula óssea com múltiplas complicações infecciosas. Sua anemia e trombocitopenia requereram transfusões freqüentes de células sangüíneas vermelhas e substituição plaquetária.

Devido ao estágio avançado da doença e à função prejudicada da medula óssea, uma quimioterapia mais agressiva ou em uma dose maior não era indicada nessa paciente. O tratamento com o anticorpo anti-CD20 "rituximab" não era apropriado, uma vez que a eficácia do rituximab na B-CLL não foi claramente demonstrada até o momento.

Uma análise por FACS revelou que 95% das células do sangue periférico da paciente eram células CD19 positivas, ao passo que 77% das células expressava, o antígeno CD20. A incubação das células do sangue periférico da paciente com o bscCD19xCD3 mostrou uma depleção pronunciada de células B CD19-positivas (veja exemplo 5). Portanto, os médicos decidiram tratar a paciente com o novo bscCD19xCD3 em um uso compassivo. A paciente foi informada em detalhes acerca do caráter novo do composto e acerca dos riscos e benefícios potenciais desse tratamento. Ela compreendeu totalmente as explicações e forneceu autorização por escrito para esse uso compassivo.

Descrição da Administração Clínica:

Antes do início do tratamento, a paciente sofreu exame clínico e procedimentos diagnósticos extensivos a fim de verificar a extensão da doença e excluir quaisquer fatores de risco adicionais. A paciente estava em uma condição clínica deficiente com anemia, trombocitopenia e perda de peso, mas sem qualquer dano cardiovascular ou outras complicações que impedissem o uso do bscCD19xCD3. Durante a noite antes dos primeiros dias de tratamento, a paciente sofreu de enxaqueca. Para a administração do bscCD19xCD3, a paciente foi mantida na ala hospitalar sob condições de assistência intensiva a fim de assegurar tratamento rápido de qualquer

emergência a qual pudesse ocorrer. A fim de impedir quaisquer reações agudas à citocina e complicações de lise do tumor, a paciente recebeu doses profiláticas IV de 2 mg de clemastina (Tavegil®) e 200 mg de cimetidina (Tagamet®), bem como 300 mg de allopurinol e 20 mg de omeprazol (Antra®).

Alcalização e heparinização foram realizadas no decorrer do tratamento e nos períodos de acompanhamento. Além disso, a paciente recebeu todo o tratamento sintomático necessário.

Amostras de sangue foram tomadas antes e durante a administração da droga a fim de acompanhar os parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos.

1ª administração de bscCD19xCD3 (14 de Abril de 1999):

A paciente recebeu a primeira dose de 3 µg de bscCD19xCD3 como uma infusão de 20 minutos em tampão isotônico de fosfato contendo 5% de albumina de soro humano (HSA). Durante a infusão, a paciente não teve quaisquer efeitos adversos. Cerca de 1 hora após a infusão, a paciente teve calafrios durante cerca de 5 minutos, seguido por transpiração, uma diminuição moderada da pressão sangüínea para cerca de 10 mmHg e um aumento moderado da temperatura corporal (+ 0,5 °C) durante umas poucas horas. Além disso, sua dor de cabeça piorou ligeiramente. A paciente foi tratada com mais 2 mg de Tavegil e 200 mg de Tagamet, 250 mg de prednisona (Solu-Decortin®) e 50 mg de petidina (Dolantin®). Todos os sintomas desapareceram sem seqüelas no mesmo dia.

2ª Administração de bscCD19xCD3 (15 de Abril de 1999):

Uma segunda dose de 10 µg de bscCD19xCD3 foi fornecida um dia depois sob as mesmas condições. Cerca de 1 hora após a infusão, a paciente teve calafrios acentuados, febre (39,2 °C), ligeira hiperventilação e uma reação hipotensiva. A paciente foi tratada com 2 mg de Tavegil, 200 mg de Tagamet e 300 mg de Solu-Decortin e 15 mg de piritramida (Dipidolor®). Para estabilização de sua função cardiovascular, a paciente recebeu uma infusão de dopamina e recebeu substituição de volume. Em seguida a esse tratamento, os sintomas diminuíram acentuadamente. Em qualquer caso, a

paciente foi transferida para o departamento de cardiologia durante a noite a fim de assegurar monitoramento apropriado dos sinais vitais e intervenção imediata no caso de emergência. A paciente foi transferida para a ala normal na manhã seguinte sem ter quaisquer outras complicações.

- 5 Durante os próximos 3 dias, a paciente continuou tendo temperatura subfebril (cerca de 37,2 °C) e desenvolveu efusão pleural mínima um dia depois da segunda dose (16 de Abril de 1999) e edema leve das extremidades inferiores (18 de Abril de 1999). A função cardiovascular permaneceu estável e as avaliações laboratoriais não revelaram alterações acentuadas com relação à segurança, exceto no que refere-se a um aumento de γ -glutamyltransferase após a segunda dose de bscCD19xCD3 (Figura 15).

Uma vez que o bscCD19xCD3 foi tolerado pela paciente e os efeitos adversos puderam ser controlados com tratamento sintomático, a administração do novo bscCD19xCD3 será continuada nessa paciente.

15 **Eficácia Clínica e Imunológica do bscCD19xCD3:**

Resultados Clínicos:

- Exame ultra-sônico do baço e de cinco nódulos linfáticos axilares e abdominais foi realizado um dia e 4 dias após a administração da segunda dose de bscCD19xCD3. Já um dia após a dose de 10 μ g (16 de Abril de 1999), os nódulos linfáticos bem como o baço mostraram uma retração de cerca de 20%, quando comparado à avaliação de linha de base. Essa observação foi confirmada em uma segunda avaliação ultra-sônica realizada em 19 de Abril de 1999. O peso do baço diminuiu em 350 g (de 1630 g na linha de base para 1280 g em 19 de Abril de 1999) (tabela 1; Figura 16).

25 **Resultados Hematológicos:**

- O número de células sangüíneas brancas, as quais incluem principalmente células B, diminuiu durante o curso do tratamento e nos dias de acompanhamento (tabela 2; Figura 17). A proteína C-reativa (CRP) é uma proteína de reação em fase aguda a qual reflete a ativação das células T e o efeito das citocinas pró-inflamatórias. Ela aumentou acentuadamente após a administração de 10 μ g de bscCD19xCD3, seguido por uma diminuição contínua durante os próximos 3 dias de observação (tabela 2; Figura

18).

Resultados Imunológicos:

O nível de citocinas no soro, o qual reflete a resposta imune aguda à administração do composto, foi medido antes e em vários intervalos após a administração do novo composto. Os níveis de citocina no soro e do receptor solúvel IL-2 foram medidos através de um ensaio ELISA quantitativo de acordo com as instruções do fabricante.

O fator de necrose de tumor TNF- α aumentou significativamente de uma maneira dose-dependente dentro da primeira hora após a administração de bscCD19xCD3 (Figura 19). A interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) também mostraram um aumento significativo e dose-dependente. Seus níveis máximos foram observados 2 a 4 horas após a administração do bscCD19xCD3 (Figuras 20, 21). Todas as citocinas retornaram aos níveis de linha de base dentro de umas poucas horas.

O receptor solúvel IL-2 foi elevado já na linha de base, o que pode ser explicado pela massa de células B malignas que expressam o receptor IL-2. Em seguida à administração do novo bscCD19xCD3, um aumento no receptor solúvel IL-2 foi observado, o que indica uma ativação de células efetadoras (Figura 22).

Conclusão:

O novo bscCD19xCD3 foi administrado seguramente a uma paciente sofrendo de B-CLL reincidente. A capacidade de tolerância do bscCD19xCD3 em doses de 3 μ g e 10 μ g era aceitável e pôde ser bem controlada por meio de medidas profiláticas e tratamento sintomático.

O novo bscCD19xCD3 causou uma retração do baço e nódulos linfáticos previamente edemasiados da paciente, conforme mostrado no exame por ultra-som. Uma vez que o edemasiamento do baço e nódulos linfáticos é causado por infiltrações com células B malignas, a retração reflete a destruição das células B malignas como um resultado da administração do bscCD19xCD3.

Em contraste acentuado a qualquer outro anticorpo CD19xCD3 biespecífico conhecido na técnica, o anticorpo CD19xCD3 biespecífico da

invenção (bscCD19xCD3) exibe eficácia clínica em linfoma não-Hodgkin derivado de células B, quando medido através da retração dos órgãos linfóides infiltrados por células B malignas. Vantajosamente, o bscCD19xCD3 provou ser clinicamente efetivo em doses surpreendentemente baixas, as
5 quais são bem toleradas após administração sistêmica. Assim, a eficácia clínica do bscCD19xCD3 confirma sua excepcional atividade citotóxica, conforme determinado *in vitro*.

Tabela 1: O efeito do bscCD19xCD3 sobre o tamanho do nódulos linfáticos e baço em uma paciente sofrendo de linfoma das células B

Medições pelo ultra-som		12 de Abril de 1999	16 de Abril de 1999	19 de Abril de 1999
5	Nódulos linfáticos			
	Abdominal	1) 54 x 29 14 mm	42 x 30 x 13 mm	42 x 30 x 13 mm
		2) 56 x 33 x 18 mm	43 x 33 x 18 mm	43 x 30 x 16 mm
		3) 46 x 32 x 27 mm	46 x 31 x 22 mm	47 x 32 x 23 mm
	Axilar	Esquerdo	36 x 24 x 16 mm	34 x 22 x 15 m
		30 x 22 x 14 mm		
	10	Direito	37 x 24 x 13 mm	33 x 20 x 11 mm
		32 x 23 x 14 mm		
Baço		270 x 146 x 69 mm	265 x 132 x 64 mm	265 x 128 x 63 mm
		1630 g	1340 g	1280 g

Os tamanhos de três nódulos linfáticos abdominais, um nódulo linfático axilar esquerdo e um direito e do baço foram determinados e medidos através de sonografia usando-se um dispositivo Toshiba SSA100. Os tamanhos são fornecidos em três dimensões e em mm. O peso do baço foi

5 calculado a partir de sua dimensão e densidade pelo ultra-som.

Tabela 2: Níveis de identificadores selecionados no sangue em resposta aos tratamentos com o bscCD19xCD3

		14 de Abril de 1999	15 de Abril de 1999	16 de Abril de 1999	17 de Abril de 1999	18 de Abril de 1999	19 de Abril de 1999
Unidades							
GGT	U/l	22	24 (manhã)	124 (6.00h)	96	89	87
			- (noite)	107 (12.00 h)			
LDH	U/l	618	536 (manhã)	548	697	551	539
			773 (noite)				
Leucócitos	Gp/l	46,8	43,3 (manhã)	36,9	37,0	28,3	36,6
			22,3 (noite)				
Linfócitos	%	85	58,8 (manhã)	60,9	64,4	65,5	88
			82,0 (noite)				
GRP	mg/dl	<0,4	1,0 (manhã)	5,2	2,5	2,0	0,7
			0,7 (noite)				

Os níveis de gama-glutamil transferase (GGT), deidrogenase de lactato (LDH) e proteína C-reativa (CRP) foram determinados por meio de métodos bioquímicos clínicos padrões e são expressos como Unidades/ml (GGT), Unidades/l (LDH) e mg/dl (CRP). O número de leucócitos é expresso
5 como Giga pontos/l e os números de linfócitos são representados como o percentual de leucócitos totais. Os níveis da linha de base em 14 de Abril de 1999, antes do tratamento, são fornecidos na primeira coluna. A resposta a 3 µg de bscCD19xCD3 em 15 de Abril (o qual foi administrado em 14 de Abril) é mostrada na segunda coluna. A resposta a um segundo tratamento
10 com 10 µg de composto no mesmo dia é mostrada na terceira coluna. Os níveis dos identificadores selecionados no sangue durante quatro dias em seguida aos tratamentos com a droga são fornecidos nas quatro últimas colunas.

Referências:

1. Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995), 7021-5
2. Gianni, N Engl. J. Med. 336 (1997), 1290-7
3. Urban, J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (1990), 29-37
4. Fisher, Cancer (1994)
5. Bohlen, Blood 82 (1993), 1803-121
6. Bohlen, Cancer Res 53 (1993), 18:4310-4.
7. Bohlen, Cancer Res 57 (1997), 1704-9.
8. Haagen, Clin Exp Immunol 90 (1992), 368-75.
9. Haagen, Cancer Immunol Immunother. 39 (1994), 391-6.
10. Haagen, Blood 84 (1994), 556-63.
11. Haagen, Blood 85 (1995), 3208-12.
12. Weiner, Leuk Lymphoma 16 (1995), 199-207.
13. Csoka, Leukemia 10 (1996), 1765-72.
14. Uckun, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8603-7.
15. Staerz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 1453-7.
16. Lanzavecchia, Eur J Immunol 17 (1987), 105-11.
17. Mallender, J Biol Chem 269 (1994), 199-206.
18. Gruber, J Immunol 152 (1994), 5368-74.
19. Kostelny, J Immunol 148 (1992), 1547-53.
20. Mack, J Immunol 158 (1997), 3965-70.
21. Kufer, Cancer Immunol Immunother 45 (1997), 193-7.
22. Pezzutto, J Immunol 138 (1987), 2793-9.
23. Orlandi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 3833-7.
24. Dubel, J Immunol Methods 175 (1994), 89-95.
25. Traunecker, Embo J 10 (1991), 3655-9.
26. Laemmli, Nature 227 (1970), 680-5.
27. Bohlen, J Immunol Methods 173 (1994), 55-62.
28. Demanet, Int J Cancer Suppl 7 (1992), 67-8.
29. De, J Hematother 4 (1995), 433-7.
30. Haagen, Leuk Lymphoma 19 (1995), 381-93.
31. Anderson, Blood 80 (1992), 2826-34.
32. Zhu, Int J Cancer 62 (1995), 319-24.

33. Hartmann, Blood 89(1997), 2042-7.
34. Valone, J Clin Oncol 13 (1995), 2281-92.
35. Valone, J Hematother 4 (1995), 471-5.
36. Bolhuis, Int J Cancer Suppl 7 (1992), 78-81.
37. Canevari, J Natl Cancer Inst 87 (1995), 1463-9.
38. Nitta, Lancet 335 (1990), 368-71.
39. Yokota, Cancer Res 52 (1992), 3402-8.
40. Weiner, J Immunol 152 (1994), 2385-92.
41. Maloney, Blood 84 (1994), 2457-66.
42. Reff, Blood 83 (1994), 435-45.
43. Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo multifuncional de cadeia simples, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) um primeiro domínio compreendendo um local de ligação de uma cadeia de imunoglobulina ou um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno CD19; e

(b) um segundo domínio compreendendo um local de ligação de uma cadeia de imunoglobulina ou um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno CD3 das células T humanas,

10 em que o referido primeiro domínio compreende pelo menos uma CDR da região V_H e V_L compreendendo a sequência de aminoácido codificada pela sequência de DNA representada na SEQ ID NO: 9 dos nucleotídeos 92 a 424 (V_L) e dos nucleotídeos 470 a 841 (V_H);

em que o referido segundo domínio compreende pelo menos
15 uma CDR da região V_H e V_L compreendendo a sequência de aminoácido codificada pela sequência de DNA representada na SEQ ID NO: 9 dos nucleotídeos 857 a 1213 (V_H) e dos nucleotídeos 1268 a 1585 (V_L); e

em que os referidos domínios estão dispostos na ordem V_L CD19- V_H CD19- V_H CD3- V_L CD3.

20 2. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os referidos dois domínios são conectados através de um ligante de polipeptídeo.

3. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que os referidos primeiro e/ou segundo domínio imitam ou
25 correspondem a uma região V_H e V_L de um anticorpo natural.

4. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é um anticorpo monoclonal, um anticorpo sintético ou um anticorpo humanizado.

5. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos referidos domínios é um fragmento de cadeia simples da região variável do anticorpo.
30

6. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações

de 2 a 5, caracterizado pelo fato de que o referido ligante de polipeptídeo compreende uma pluralidade de resíduos de glicina, alanina e/ou serina.

7. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 6, caracterizado pelo fato de que o referido ligante de polipeptídeo
5 compreende uma pluralidade de cópias consecutivas de uma sequência de aminoácido.

8. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 7, caracterizado pelo fato de que o referido ligante de polipeptídeo compreende de 1 a 5 resíduos de aminoácido.

10 9. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 8, caracterizado pelo fato de que o referido ligante de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido Gly Gly Gly Ser.

10. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que:

15 (a) o referido local de ligação do primeiro domínio possui uma afinidade de pelo menos cerca de 10^{-7} M; e/ou

(b) o referido local de ligação do segundo domínio possui uma afinidade de pelo menos cerca de 10^{-7} M.

20 11. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo biespecífico de cadeia simples.

12. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de que compreendendo pelo menos um outro domínio.

25 13. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o referido outro domínio é ligado através de ligações covalentes ou não covalentes.

30 14. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o referido pelo menos outro domínio compreende uma molécula efetuada tendo uma conformação adequada para atividade biológica, capaz de capturar um íon ou de se ligar seletivamente a um suporte sólido ou a um determinante pré-selecionado.

15. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o referido polipeptídeo compreende um his-tag.

5 16. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o referido polipeptídeo compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 10.

17. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que é representando pela SEQ ID NO: 9.

10 18. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 17.

19. Célula procariótica, de levedura ou unicelular, caracterizada pelo fato de que é transfectada com o polinucleotídeo como definido na reivindicação 17 ou o vetor como definido na reivindicação 18.

15 20. Método para o preparo do polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizado pelo fato de que compreende a cultura de uma célula como definida na reivindicação 19 e isolamento do referido polipeptídeo da cultura.

20 21. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, o polinucleotídeo como definido na reivindicação 17 ou o vetor como definido na reivindicação 18.

22. Composição de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que é uma composição farmacêutica opcionalmente ainda compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável.

25 23. Composição de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que é uma composição diagnóstica opcionalmente ainda compreendendo meios adequados para detecções.

30 24. Uso do polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, do polinucleotídeo como definido na reivindicação 17 ou do vetor como definido na reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de malignidades das células B, doenças auto-imunes mediadas pelas cé-

lulas B ou a depleção de células B.

25. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida malignidade das células B é linfoma de célula B, linfoma de não-Hodgkin ou leucemia linfática crônica derivada de célula B (B-CLL).

26. Uso de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que a referida doença auto-imune mediada por célula B é miastenia grave, Morbus Basedow, tireoidite de Hashimoto ou síndrome de Goodpasture.

27. Uso de polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 16, do polinucleotídeo como definido na reivindicação 17 ou vetor como definido na reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para retardar uma condição patológica que é causada por distúrbios relacionados às células B.

28. Uso de polinucleotídeo como definido na reivindicação 17 ou o vetor como definido na reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que é na preparação de composições para terapia genética.

29. Método para identificação de ativadores ou inibidores de ativação ou estimulação das células T, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) a cultura de células T e células CD19 positivas, de preferência células B, na presença de um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 16 e, opcionalmente, na presença de um componente capaz de proporcionar um sinal detectável em resposta à ativação das células T com um composto a ser selecionado sob condições que permitem a ativação das células T; e

(b) detecção da presença ou ausência de um sinal gerado a partir da interação do composto com as células.

FIG 1

Gel de SDS/Poliacrilamida , corado com azul Coomassie
de bsc CD19xCD3 Purificado

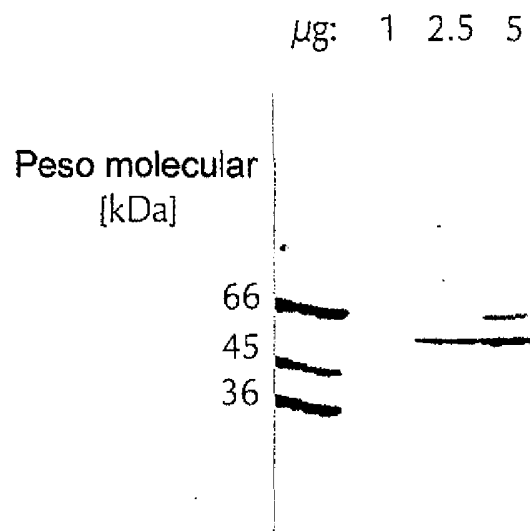


FIG 2

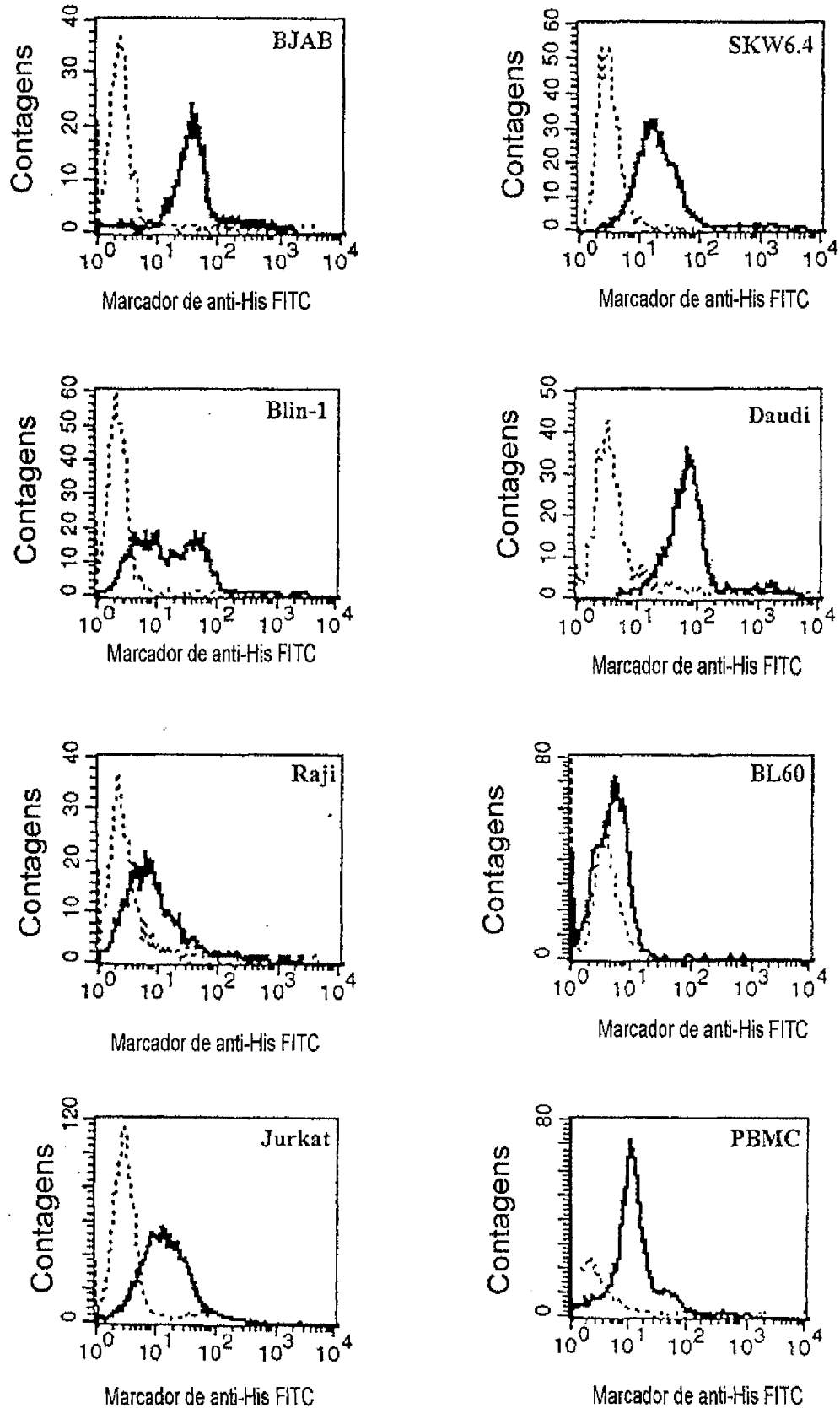


FIG 3

Citotoxicidade de CD 19xCD3 em ensaio de liberação ^{51}Cr com PBMC não estimulado contra linhagens de célula B diferentes

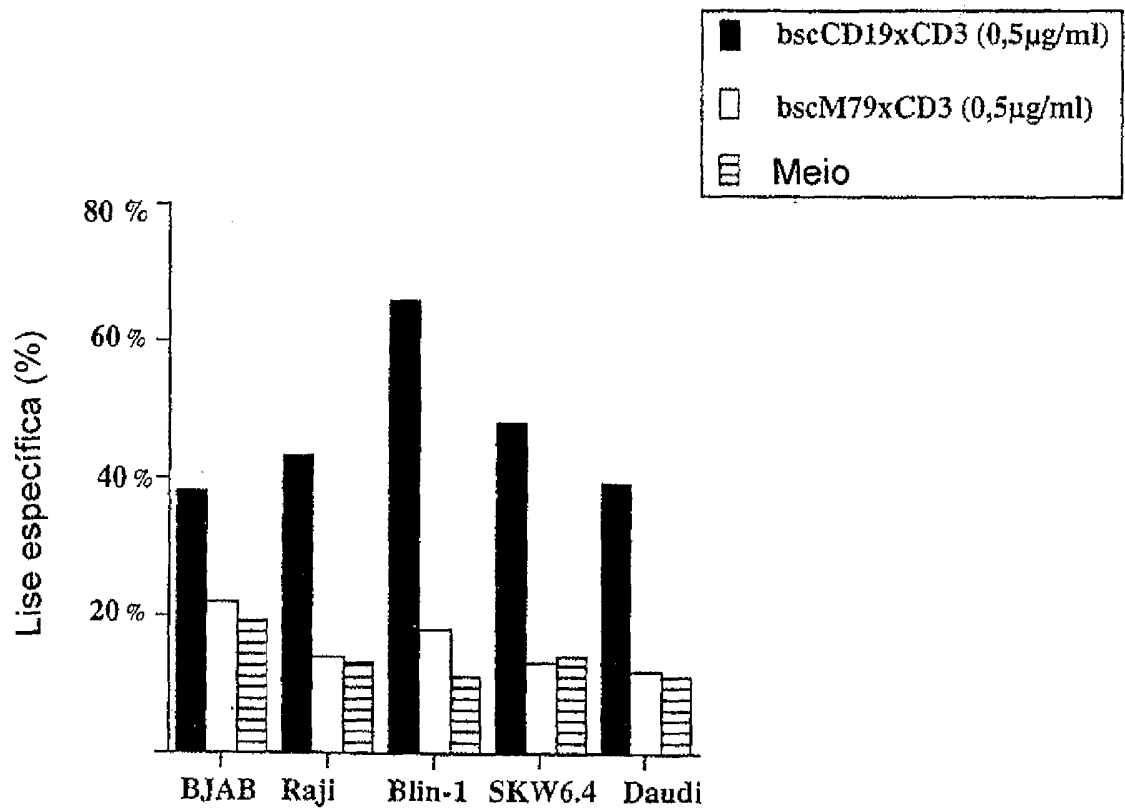


FIG 4

Ensaio de Citotoxicidade com PBMC contra CD19+ Daudi e células de plasmacitoma CD19 (L363 e NCI)

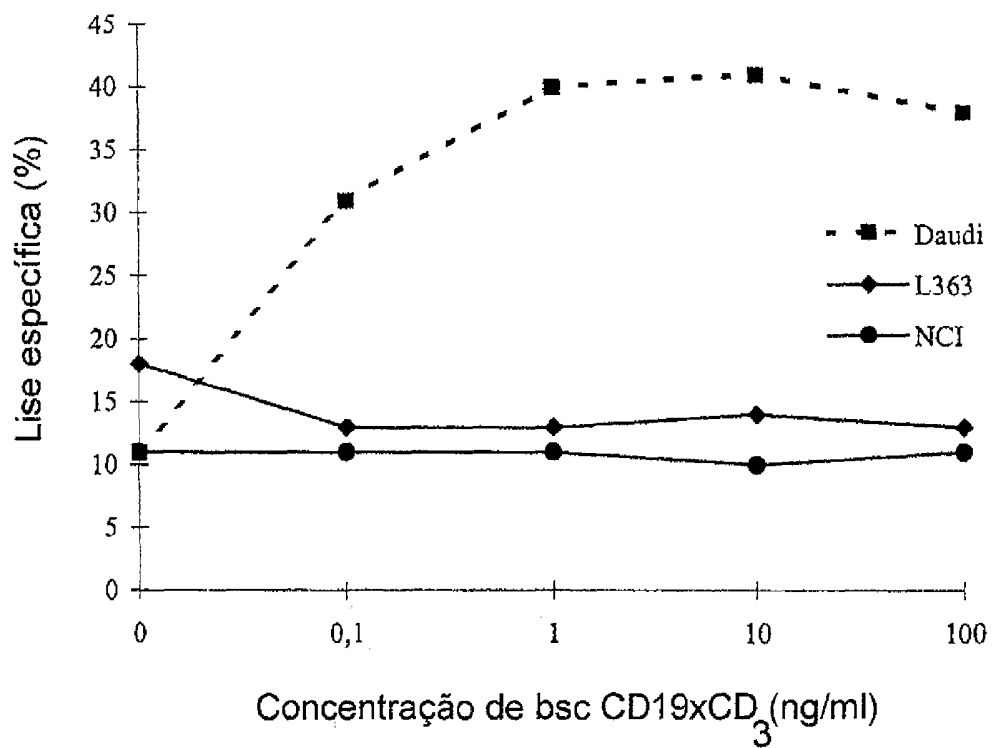


FIG 5

Inibição de Citotoxicidade de CD19xCD3 pelo
HD 37 anticorpo anti-CD19 parental

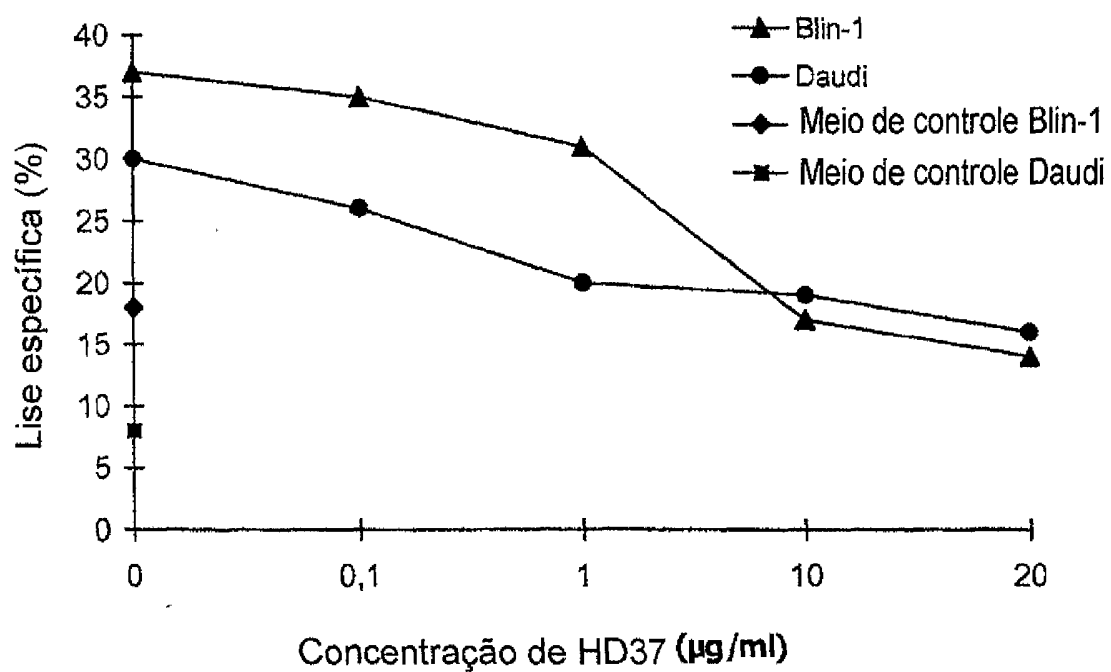
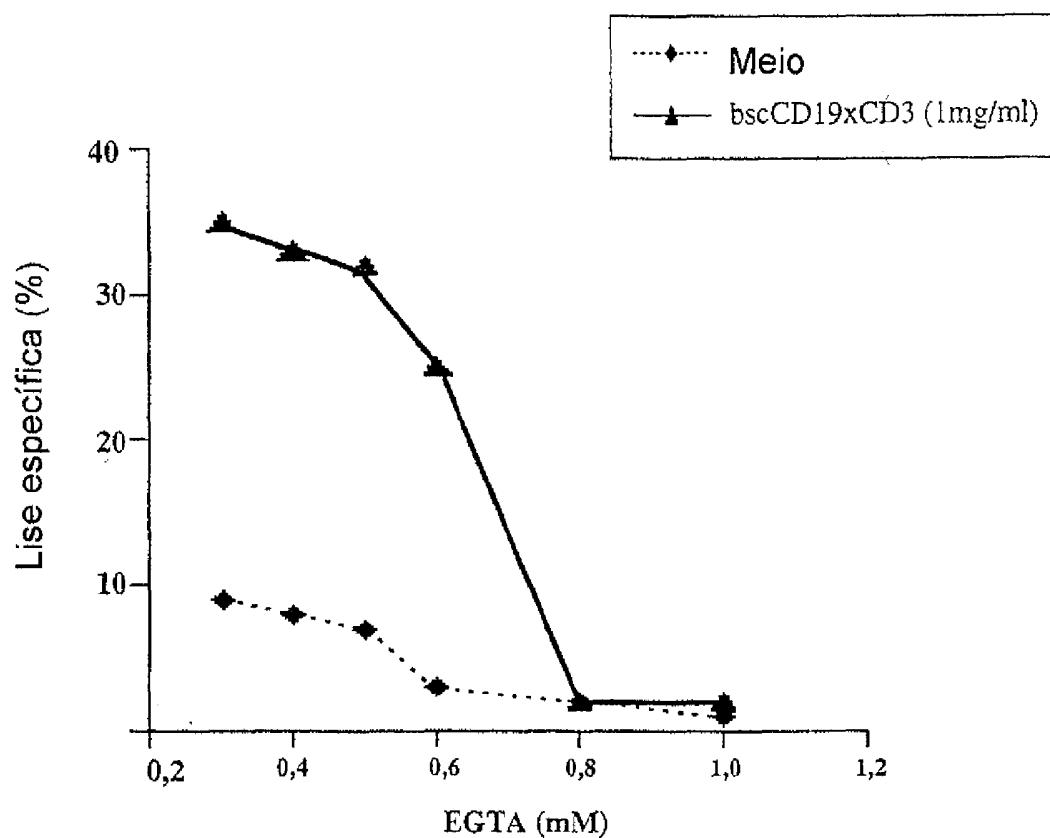


FIG 6

Ensaio de Citotoxicidade com PBMC's não estimulados contra células Daudi após adição de quantidades aumentadoras de EGTA



Citotoxicidade de bxC_D19x_CD em um ensaio de liberação de ⁵¹-Cr com PBMCs não estimulados em proporções E : T diferentes

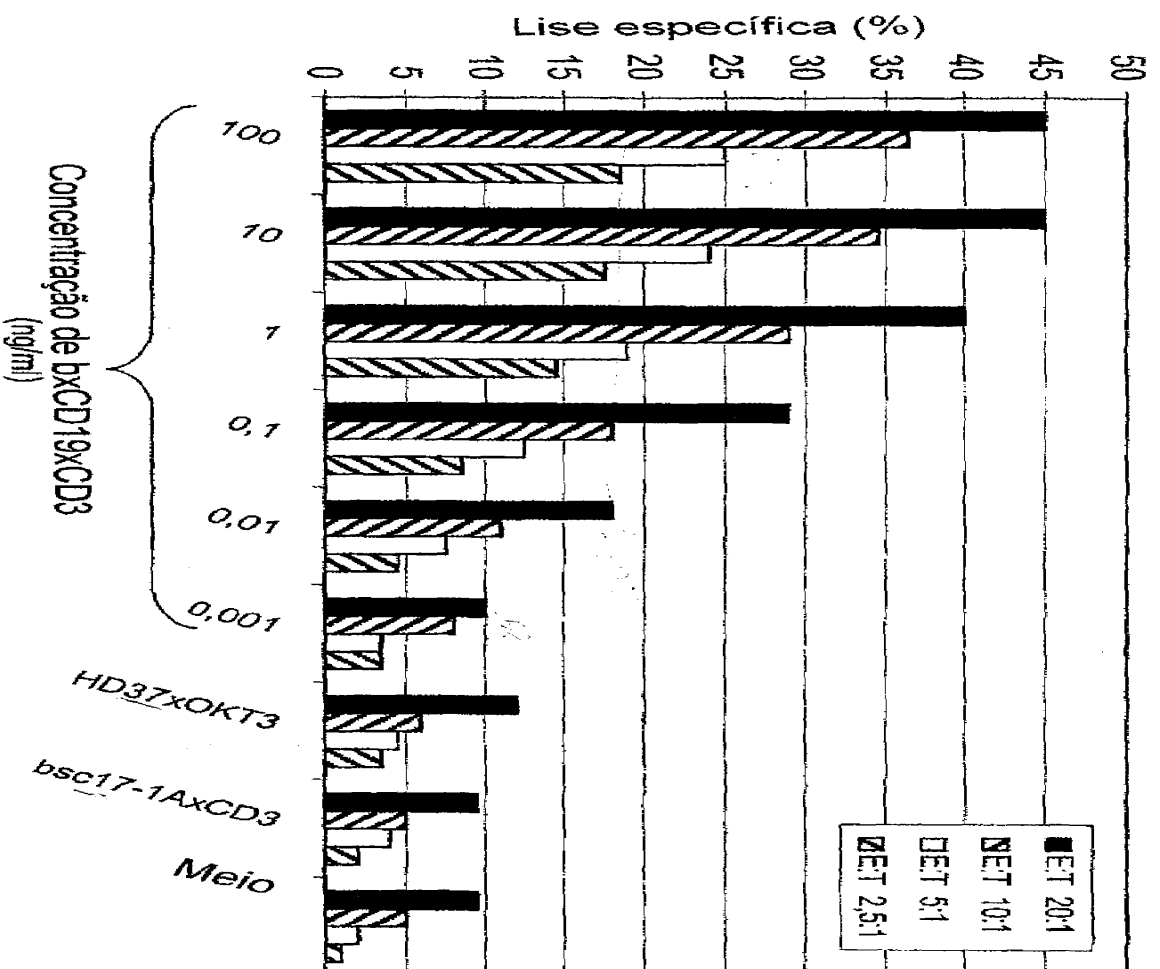


FIG 7

8/23

FIG 8

-10 -5 -1
5' G AAT TCC ACC

ATG	GGA	TGG	AGC	TGT	ATC	ATC	CTC	TTC	TTG	GTA	GCA	ACA	GCT	ACA	GGT	GTC	CAC
M	G	W	S	C	I	I	L	F	L	V	A	T	A	T	G	V	H
TCC	GAC	TAC	AAA	GAT	GAT	GAC	GAT	AAG	GAT	ATC	CAG	CTG	ACC	CAG	TCT	CCA	GCT
S	D	Y	K	D	D	D	D	K	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A
TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	GGG	CAG	AGG	GCC	ACC	ATC	TCC	TGC	AAG	GCC	AGC	CAA
S	L	A	V	S	L	G	Q	R	A	T	I	S	C	K	A	S	Q
AGT	GTT	GAT	TAT	GAT	GGT	GAT	AGT	TAT	TTG	AAC	TGG	TAC	CAA	CAG	ATT	CCA	GGA
S	V	D	Y	D	G	D	S	Y	L	N	W	Y	Q	Q	I	P	G
CAG	CCA	CCC	AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	GAT	GCA	TCC	AAT	CTA	GTT	TCT	GGG	ATC	CCA
Q	P	P	K	L	L	I	Y	D	A	S	N	L	V	S	G	I	P
CCC	AGG	TTT	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	AAC	ATC	CAT	CCT
P	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	N	I	H	P
GTG	GAG	AAG	GTG	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	CAC	TGT	CAG	CAA	AGT	ACT	GAG	GAT	CCG
V	E	K	V	D	A	A	T	Y	H	C	Q	Q	S	T	E	D	P
TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGG	ACC	AAG	CTC	GAG	ATC	AAA	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	GGC
W	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	G	G	G	G	S	G
GGC	GGC	GGC	TCC	GGT	GGT	GGT	GGT	TCT	CAG	GTG	CAG	CTG	CAG	CAG	TCT	GGG	GCT
G	G	G	S	G	G	G	G	S	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A
GAG	CTG	GTG	AGG	CCT	GGG	TCC	TCA	GTG	AAG	ATT	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAT
E	L	V	R	P	G	S	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y
GCA	TTC	AGT	AGC	TAC	TGG	ATG	AAC	TGG	GTG	AAG	CAG	AGG	CCT	GGA	CAG	GCT	CTT
A	F	S	S	Y	W	M	N	W	V	K	Q	R	P	G	Q	G	L
GAG	TGG	ATT	GGA	CAG	ATT	TGG	CCT	GGA	GAT	GGT	GAT	ACT	AAC	TAC	AAT	GGA	AAG
E	W	I	G	Q	I	W	P	G	D	G	D	T	N	Y	N	G	K
TTC	AAG	GGT	AAA	GCC	ACT	CTG	ACT	GCA	GAC	GAA	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG
F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	E	S	S	S	T	A	Y	M
CAA	CTC	AGC	AGC	CTA	GCA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	TAT	TTC	TGT	GCA	AGA	CGG
Q	L	S	S	L	A	S	E	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	R

FIG 8 (continuação)

765			774			783			792			801			810		
GAG	ACT	ACG	ACG	GTA	GGC	CGT	TAT	TAC	TAT	GCT	ATG	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGG
E	T	T	T	V	G	R	Y	Y	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G
819			828			837			846			855			864		
ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCC	TCC	GGA	GGT	GGT	GGA	TCC	GAT	ATC	AAA	CTG	CAG	CAG
T	T	V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	D	I	K	L	Q	Q
873			882			891			900			909			918		
TCA	GGG	GCT	GAA	CTG	GCA	AGA	CCT	GGG	GCC	TCA	GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	ACT
S	G	A	E	L	A	R	P	G	A	S	V	K	M	S	C	K	T
927			936			945			954			963			972		
TCT	GGC	TAC	ACC	TTT	ACT	AGG	TAC	ACG	ATG	CAC	TGG	GTA	AAA	CAG	AGG	CCT	GGG
S	G	Y	T	F	T	R	Y	T	M	H	W	V	K	Q	R	P	G
981			990			999			1008			1017			1026		
CAG	GGT	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	TAC	ATT	AAT	CCT	AGC	CGT	GGT	TAT	ACT	AAT	TAC
Q	G	L	E	W	I	G	Y	I	N	P	S	R	G	Y	T	N	Y
1035			1044			1053			1062			1071			1080		
AAT	CAG	AAG	TTC	AAG	GAC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	ACA	GAC	AAA	TCC	TCC	AGC	ACA
N	Q	K	F	K	D	K	A	T	L	T	T	D	K	S	S	S	T
1089			1098			1107			1116			1125			1134		
GCC	TAC	ATG	CAA	CTG	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCA	CTC	TAT	TAC	TGT
A	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C
1143			1152			1161			1170			1179			1188		
GCA	AGA	TAT	TAT	GAT	GAT	CAT	TAC	TGC	CTT	GAC	TAC	TGG	GGC	CAA	GGC	ACC	ACT
A	R	Y	Y	D	D	H	Y	C	L	D	Y	W	G	Q	G	T	T
1197			1206			1215			1224			1233			1242		
CTC	ACA	GTC	TCC	TCA	GTC	GAA	GGT	GGA	AGT	GGA	GGT	TCT	GGT	GGA	AGT	GGA	GGT
L	T	V	S	S	V	E	G	G	S	G	G	S	G	G	S	G	G
1251			1260			1269			1278			1287			1296		
TCA	GGT	GGA	GTC	GAC	GAC	ATT	CAG	CTG	ACC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA
S	G	G	V	D	D	I	Q	L	T	Q	S	P	A	I	M	S	A
1305			1314			1323			1332			1341			1350		
TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGA	GCC	AGT	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC
S	P	G	E	K	V	T	M	T	C	R	A	S	S	S	V	S	Y
1359			1368			1377			1386			1395			1404		
ATG	AAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAG	TCA	GGC	ACC	TCC	CCC	AAA	AGA	TGG	ATT	TAT	GAC
M	N	W	Y	Q	Q	K	S	G	T	S	P	K	R	W	I	Y	D
1413			1422			1431			1440			1449			1458		
ACA	TCC	AAA	GTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	TAT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG
T	S	K	V	A	S	G	V	P	Y	R	F	S	G	S	G	S	G
1467			1476			1485			1494			1503			1512		
ACC	TCA	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	AGC	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT
T	S	Y	S	L	T	I	S	S	M	E	A	E	D				

FIG 9

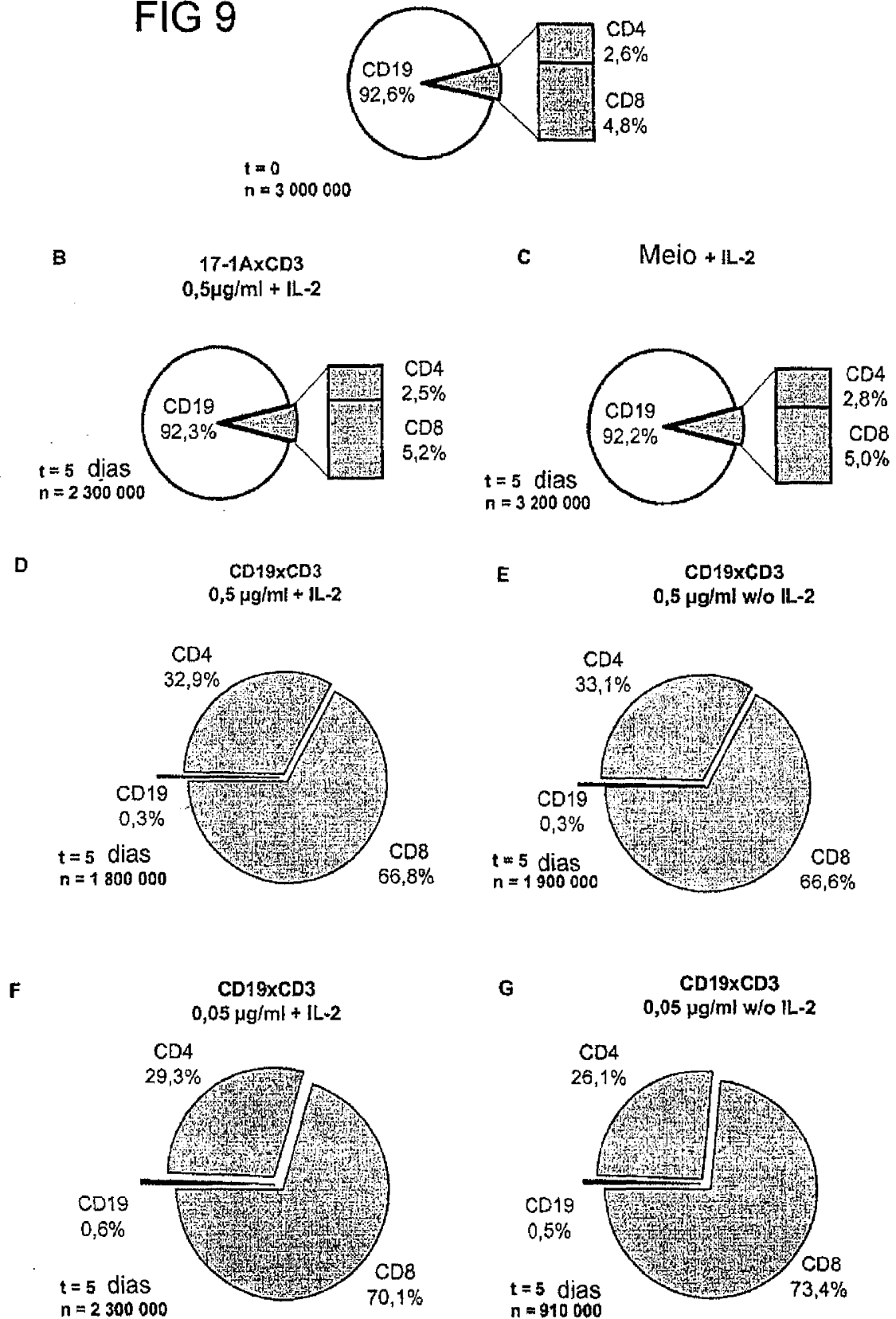


FIG 10

Purificação de bscCD19xCD3

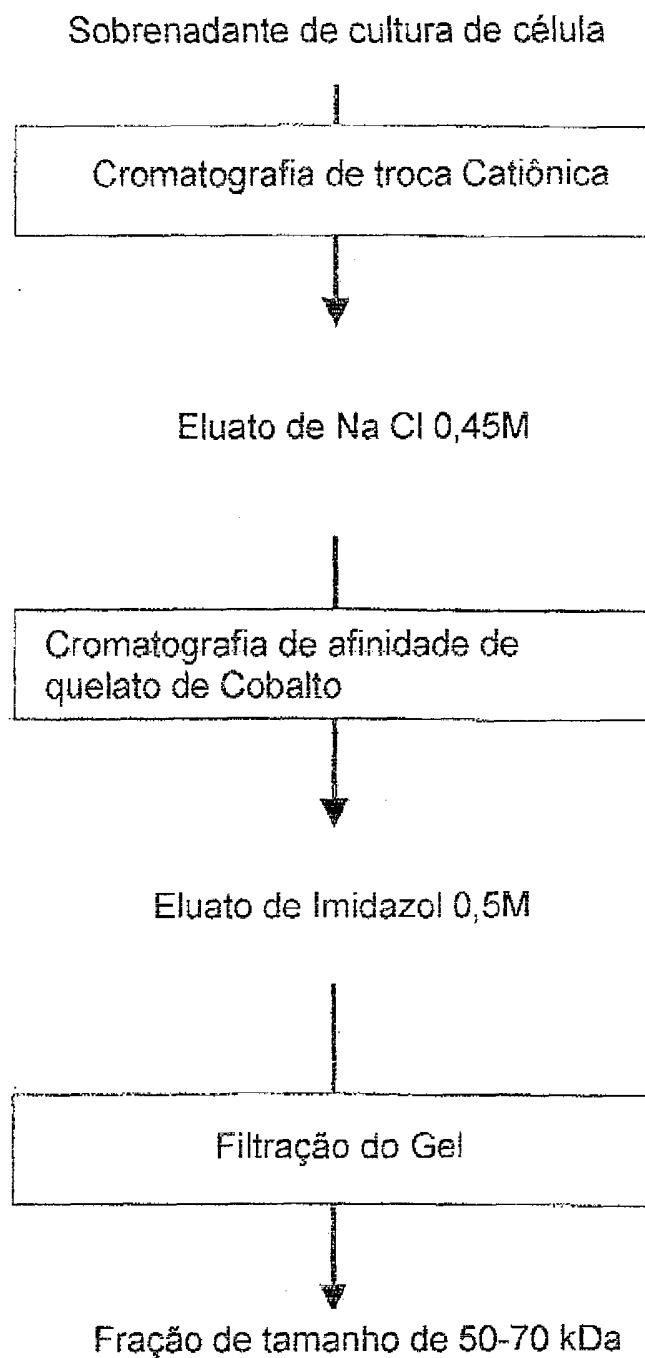
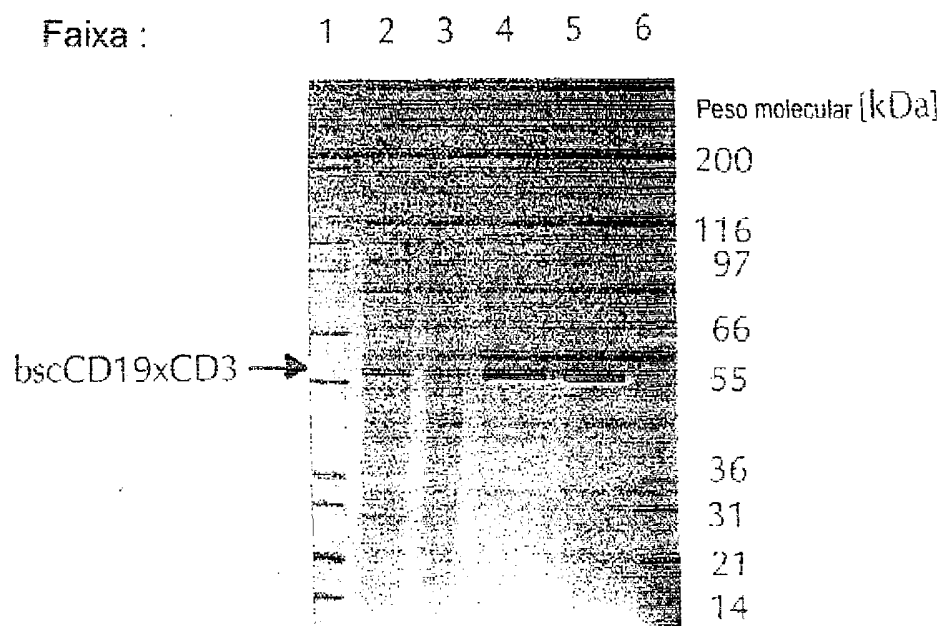


FIG 11

Análise de SDS-Page de bsc CD19xCD3



Cromatografia de troca Catiónica de bsCD19xCD3

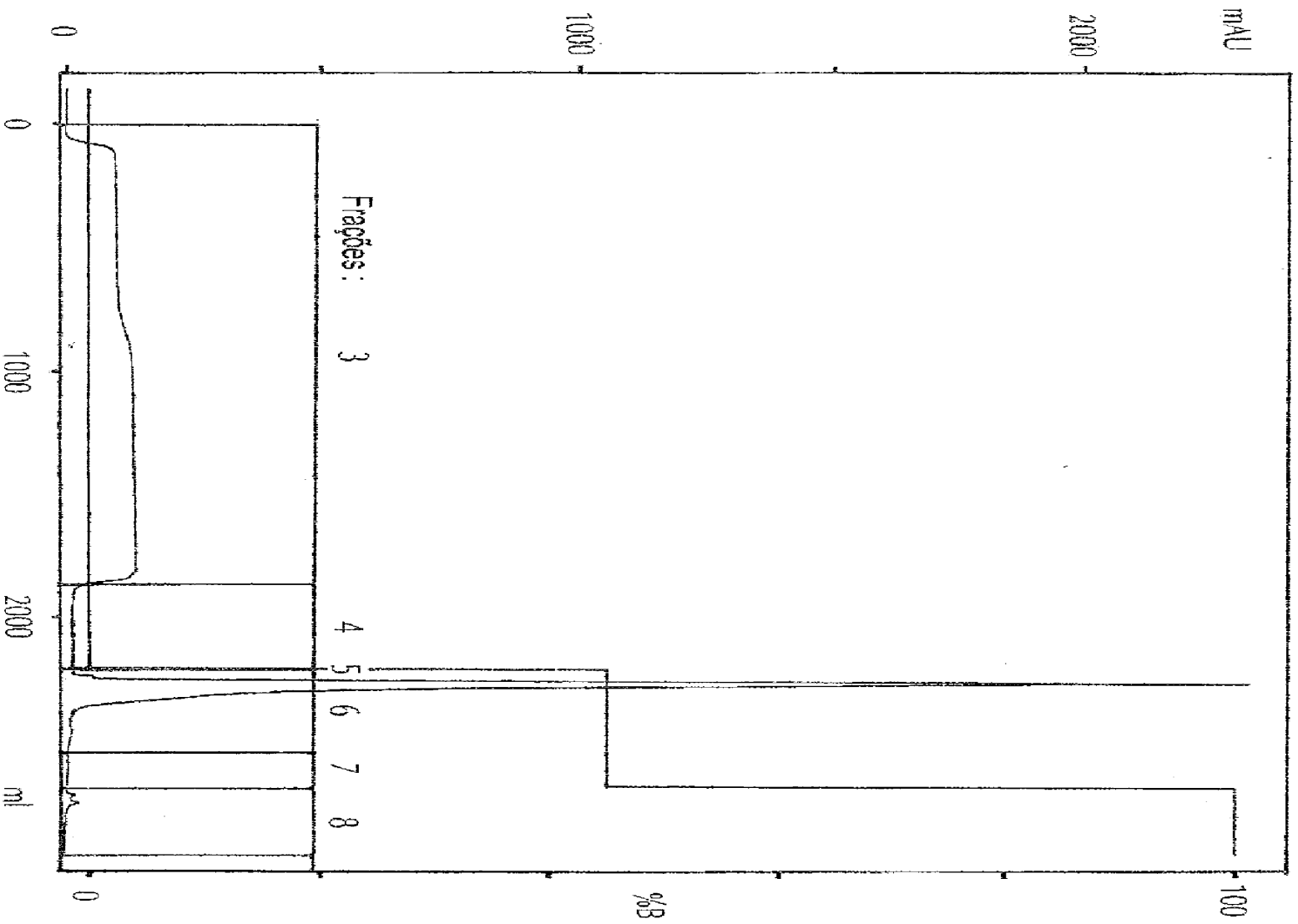


FIG 12

Cromatografia por afinidade de Quelatante Cobalto de bscCD19xCD3

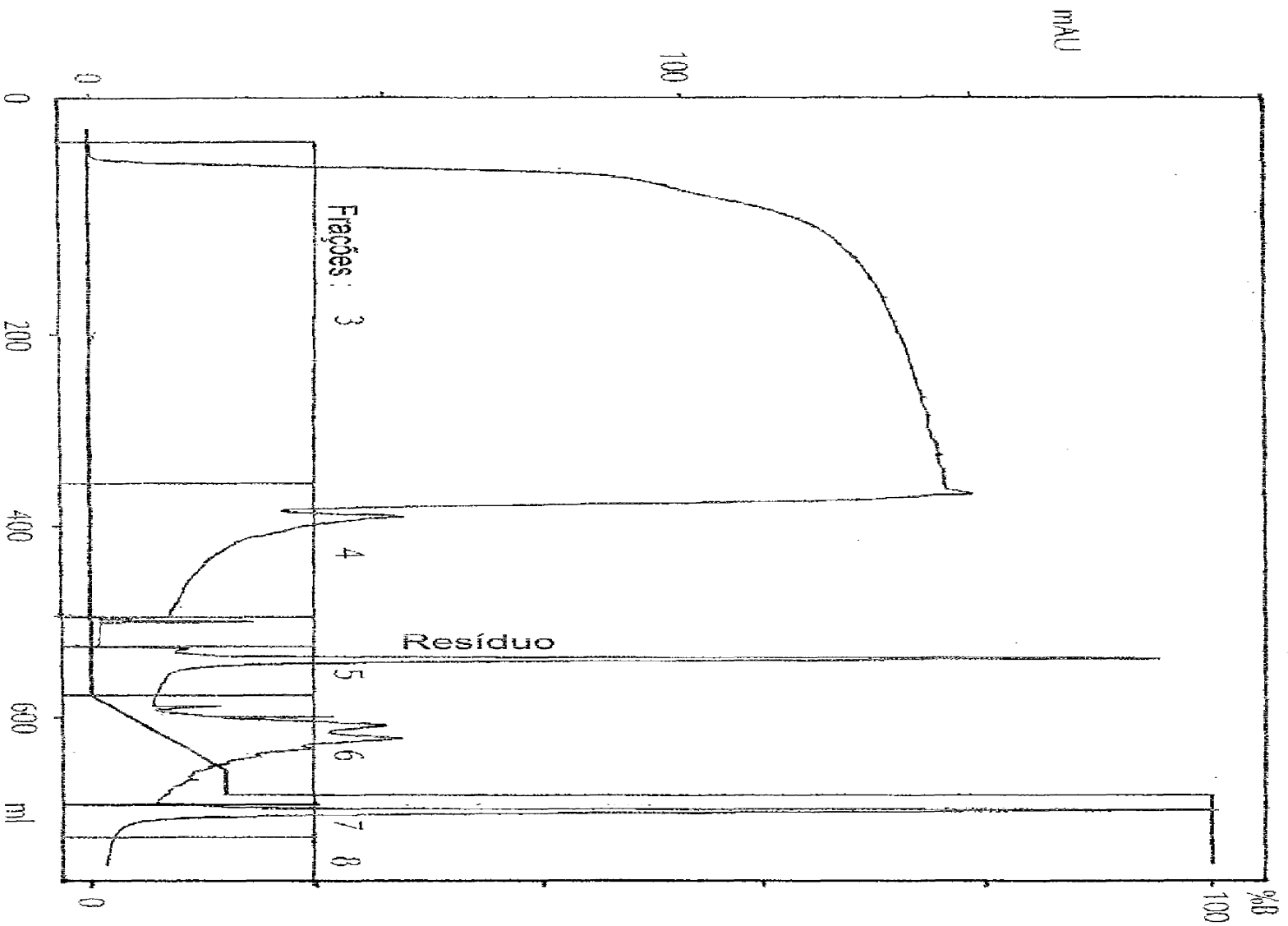


FIG 13

14/23

FIG 14

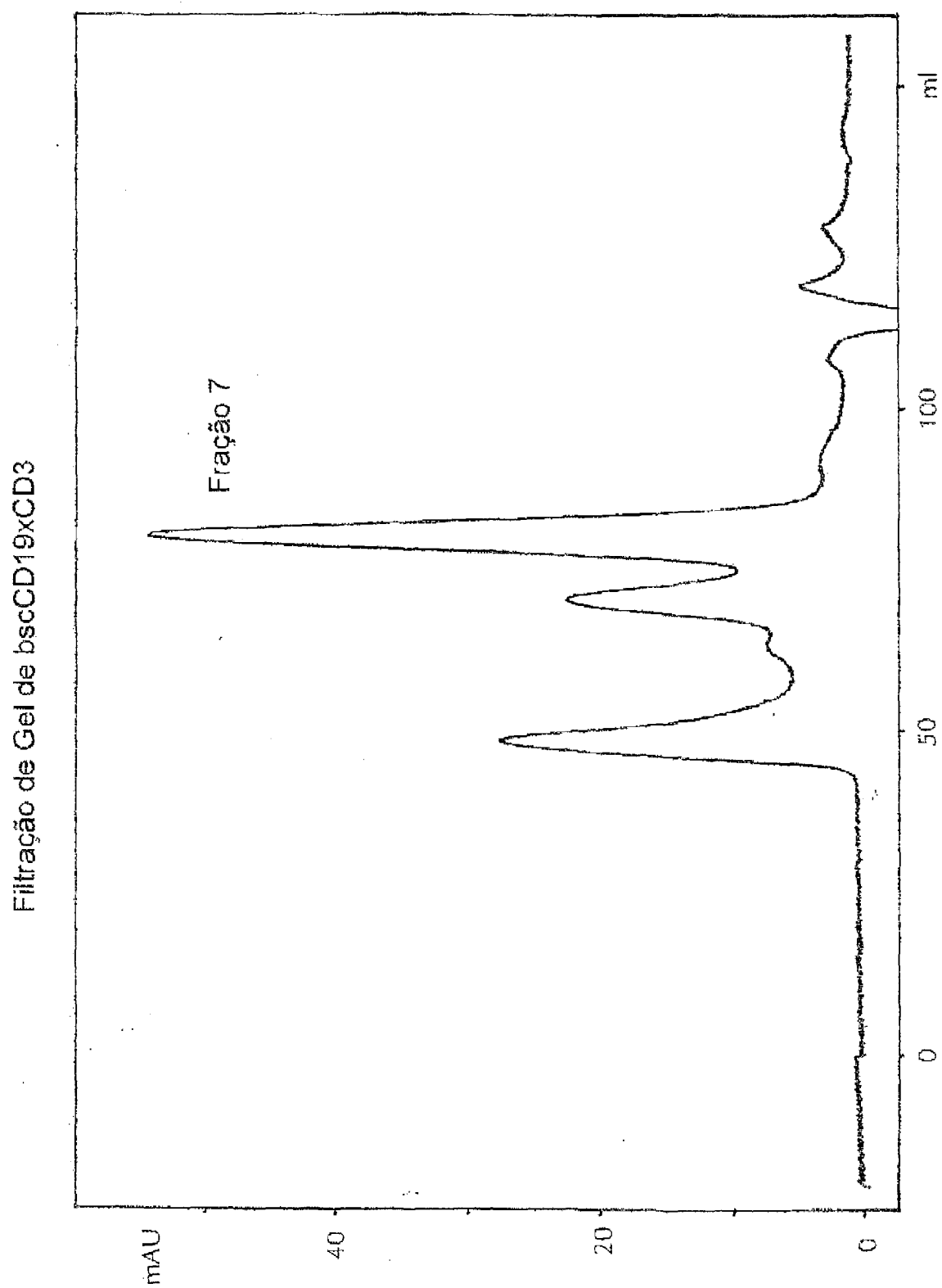
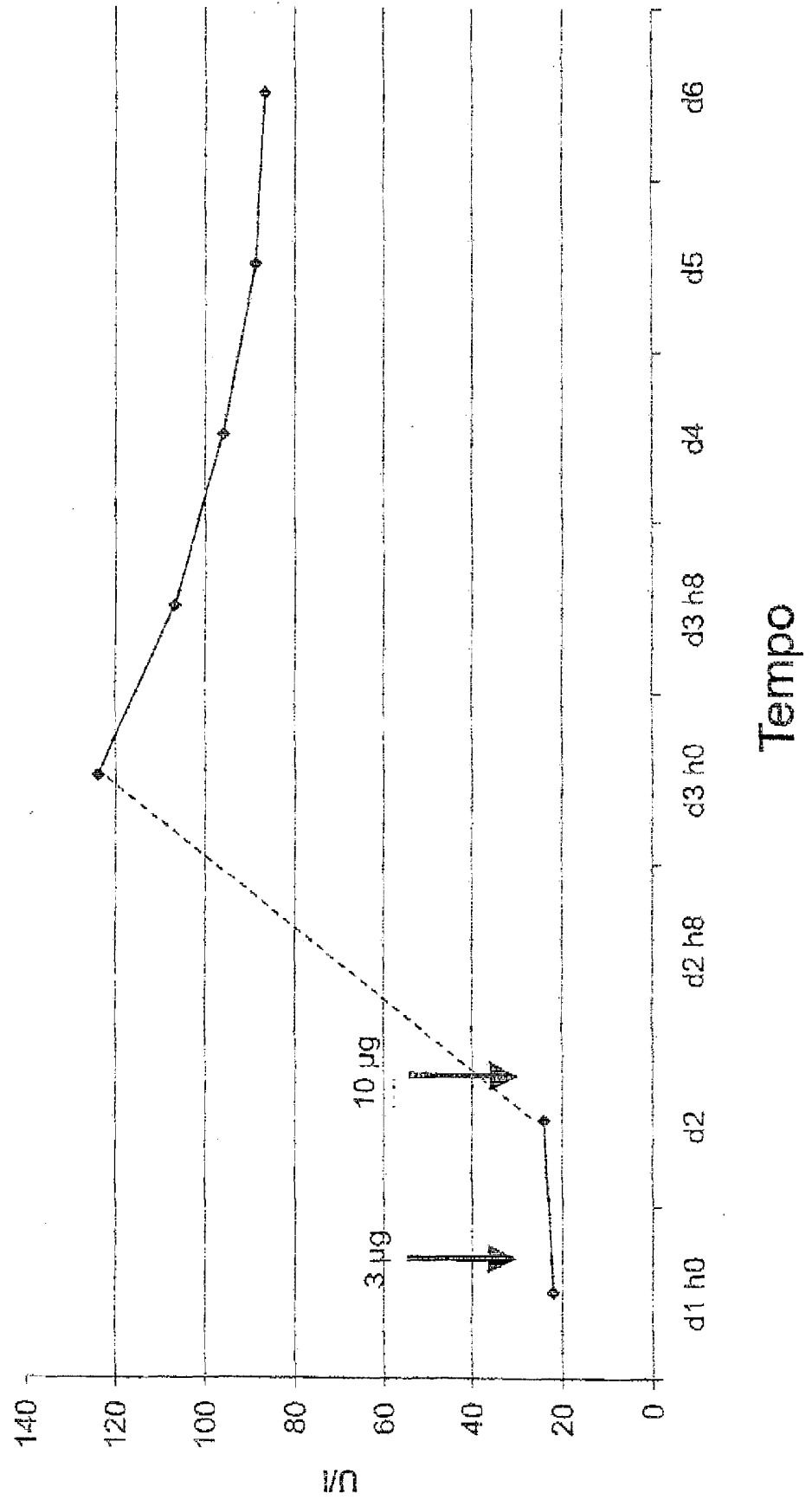


FIG 15

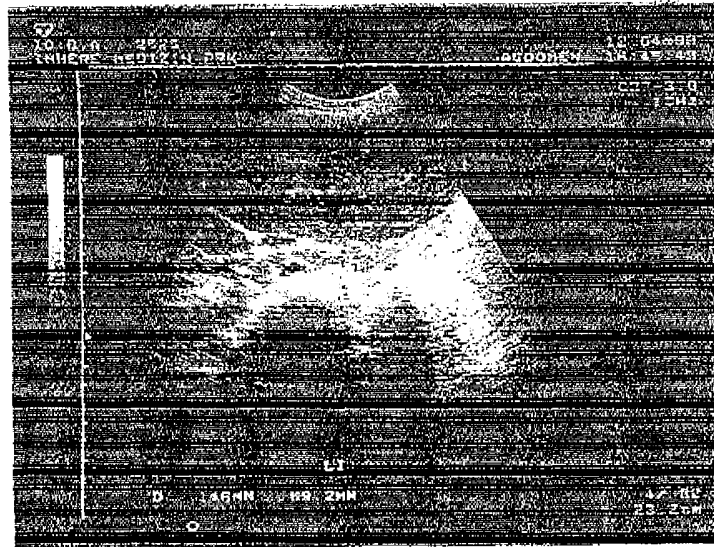
GGT



17/23

FIG 16

A



B

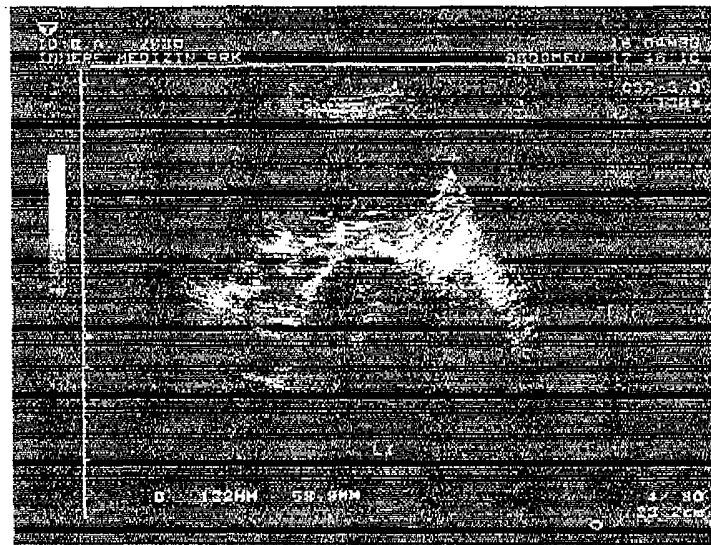


FIG 17

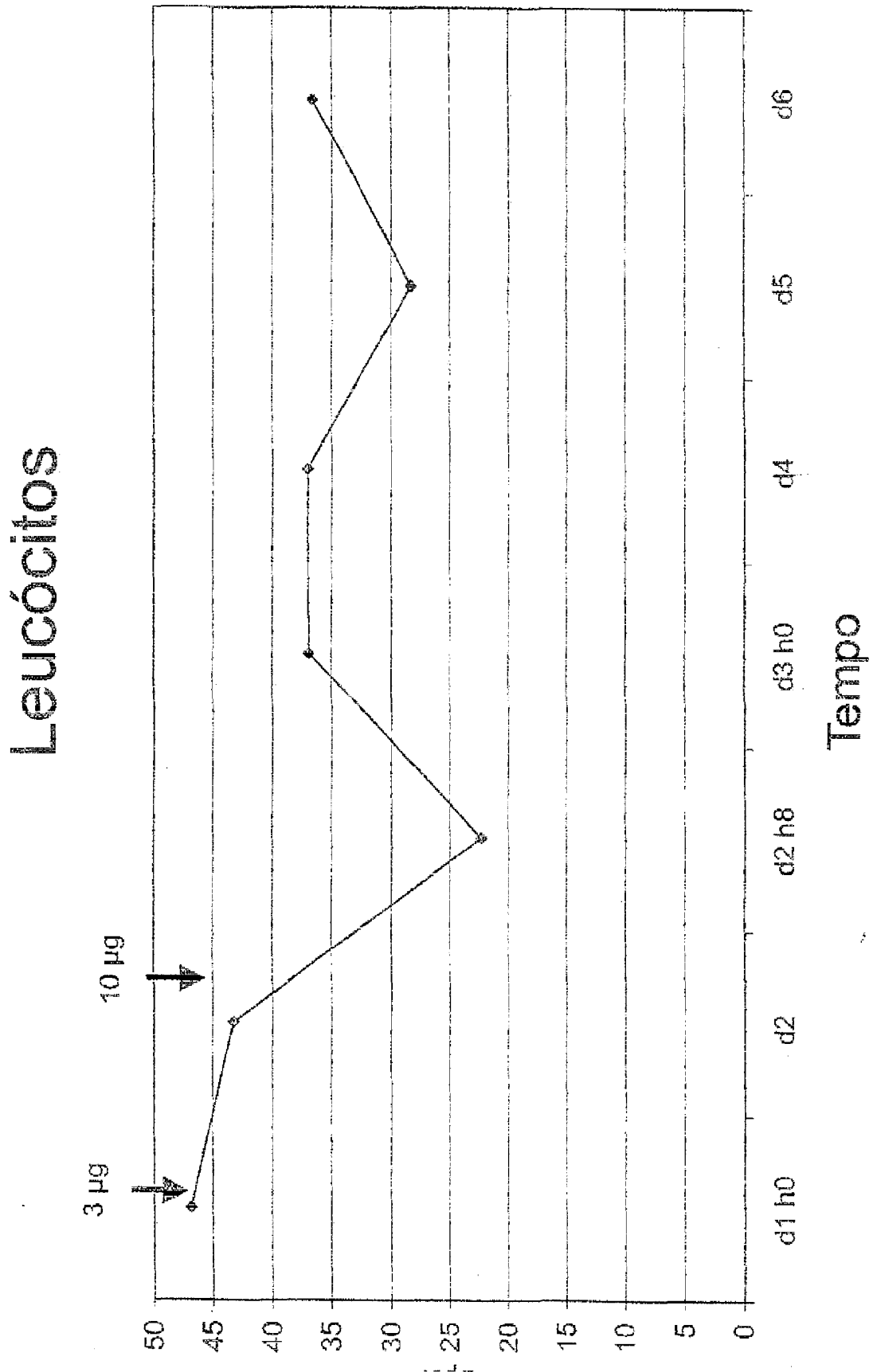


FIG 18

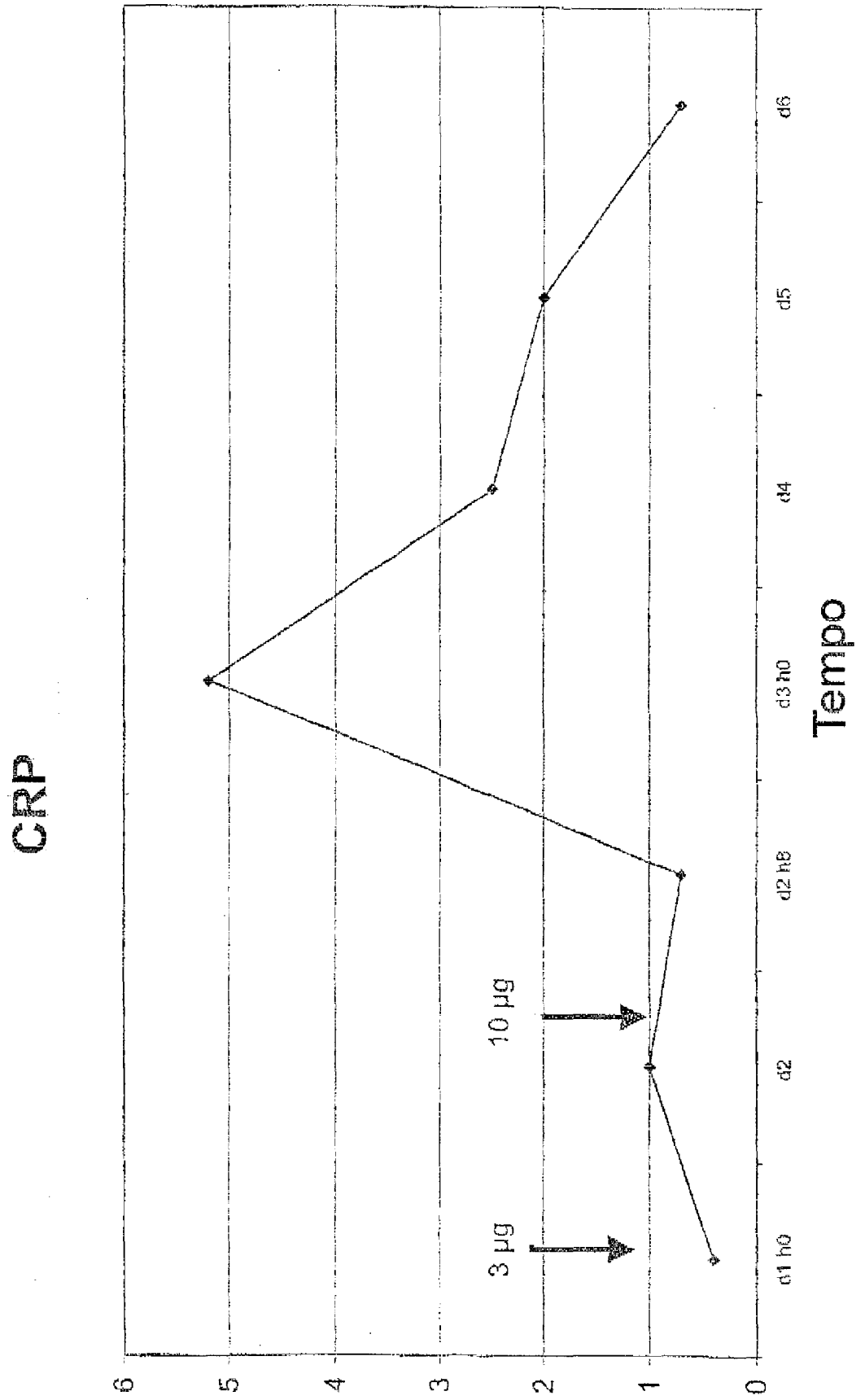


FIG 19

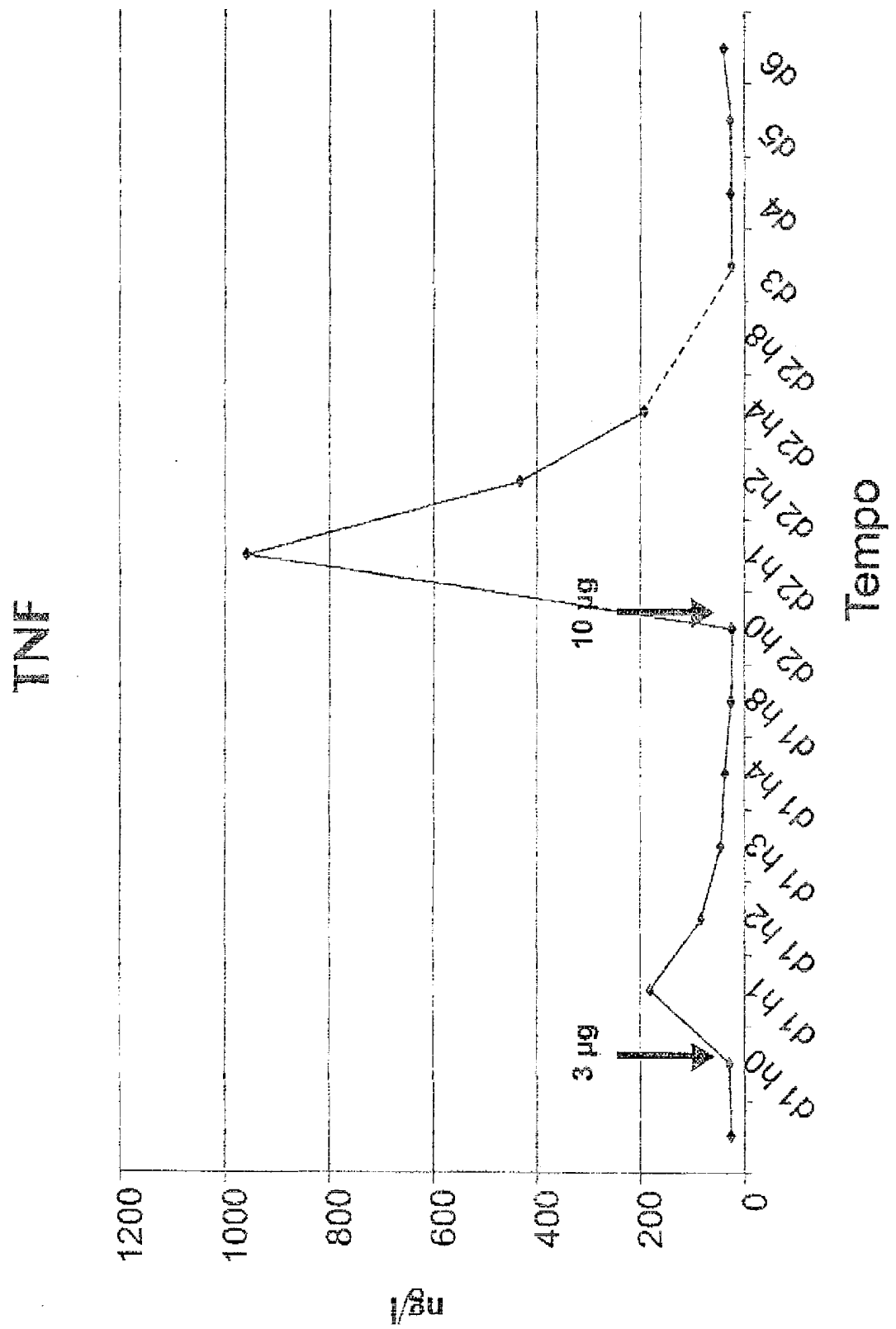


FIG 20

IL-6

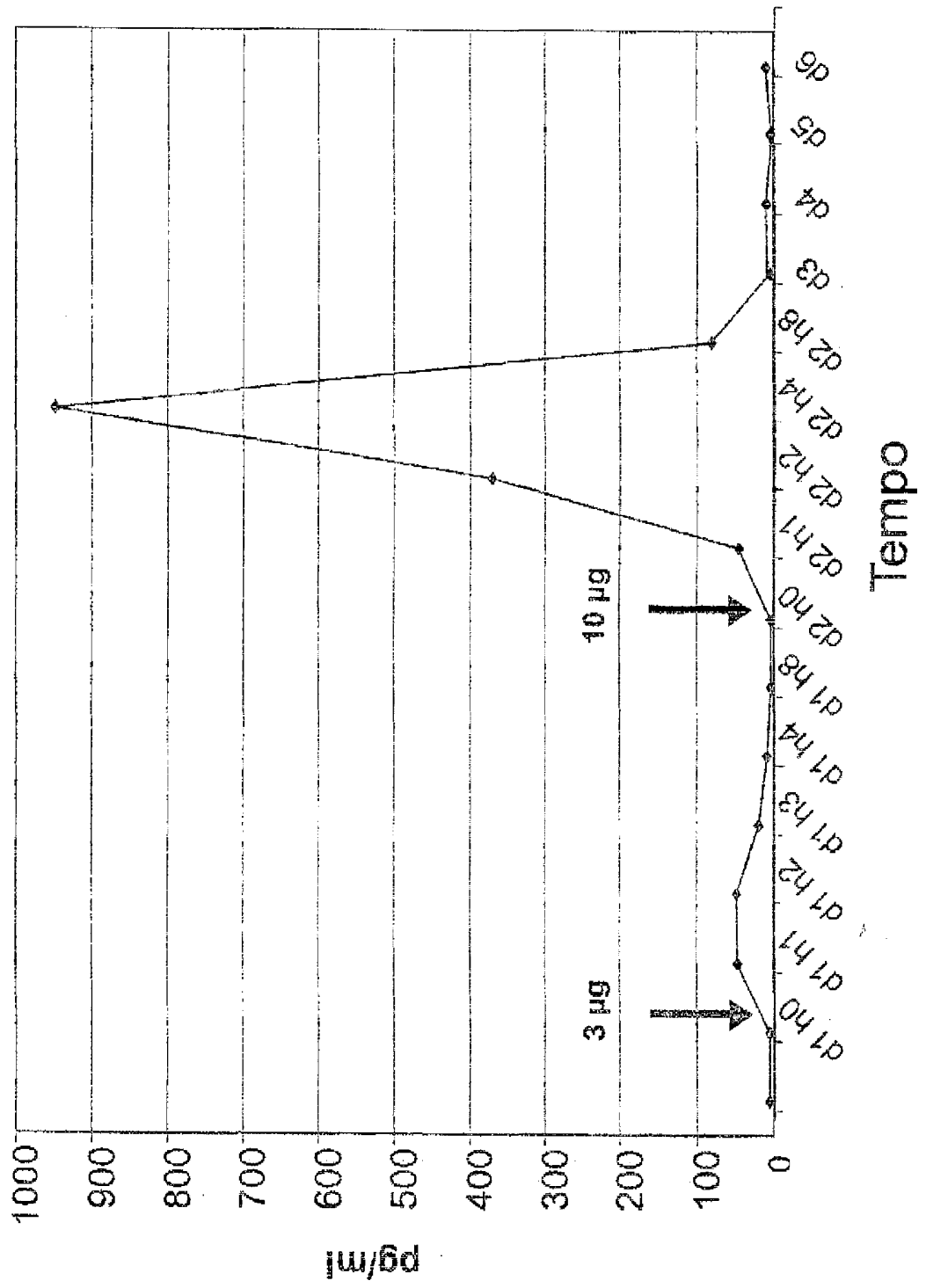


FIG 21

11-8

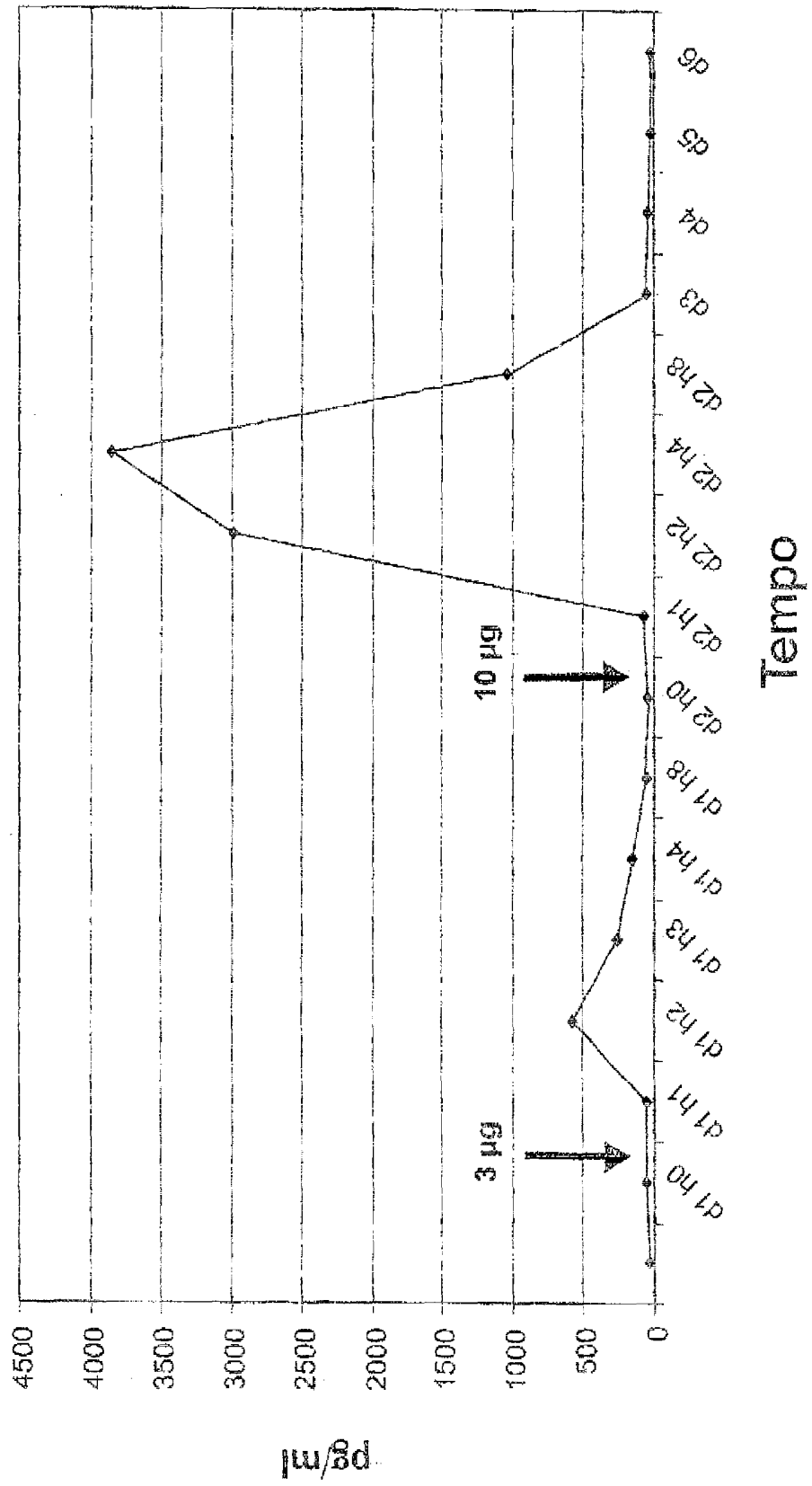
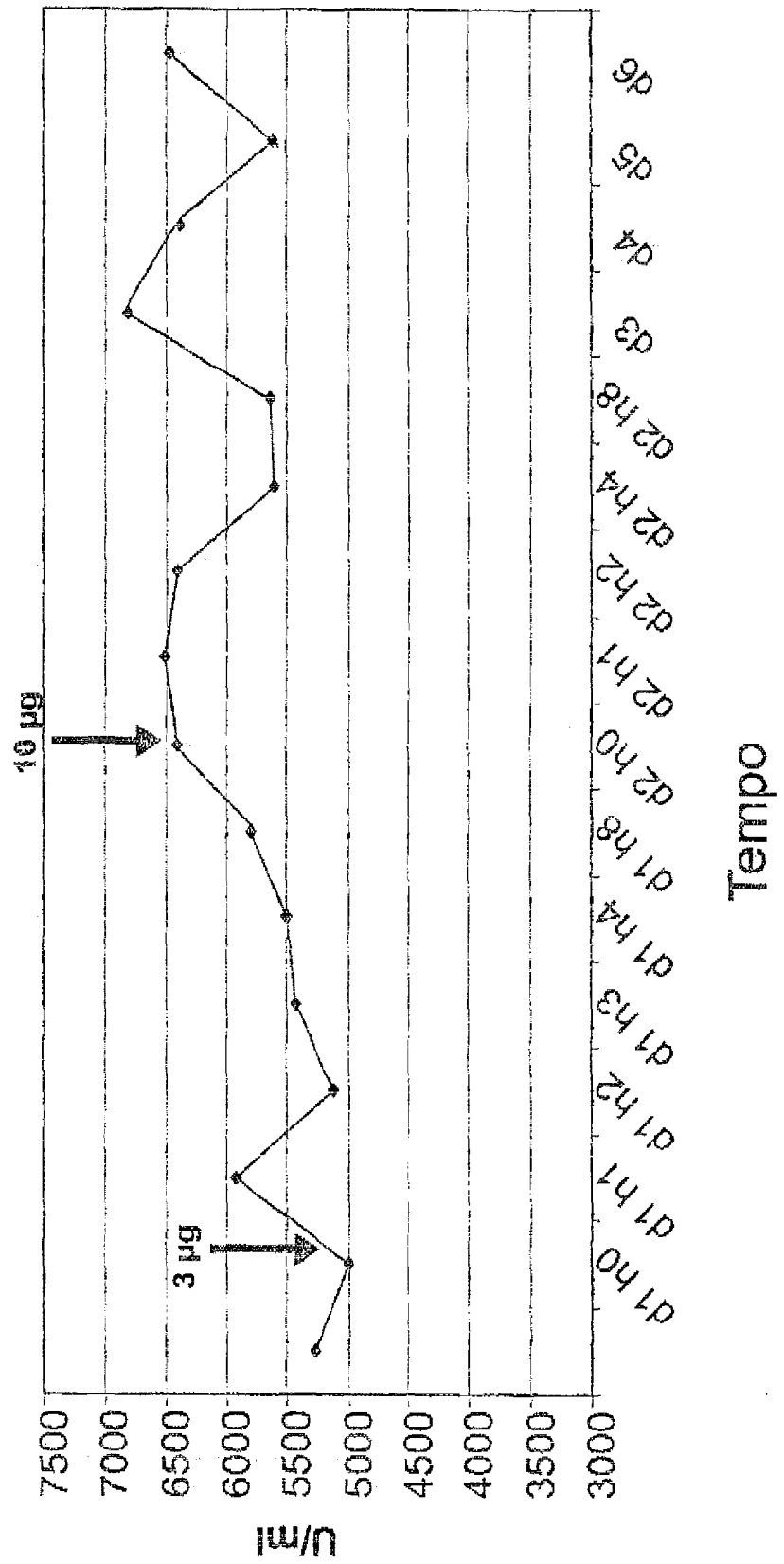


FIG 22

IL-2 R



RESUMO

Patente de Invenção: **"POLIPEPTÍDEO MULTIFUNCIONAL DE CADEIA
SIMPLES, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA PROCARIÓTICA, DE
LEVEDURA OU UNICELULAR, COMPOSIÇÃO, USOS DE POLIPEPTÍ-
5 DEO E POLINUCLEOTÍDEO E MÉTODOS PARA PREPARO DO REFERI-
DO POLIPEPTÍDEO E PARA IDENTIFICAÇÃO DE ATIVADORES OU INI-
BIDORES DE ATIVAÇÃO OU ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS T".**

A presente invenção refere-se a novos polipeptídeos multi-
funcionais de cadeia simples compreendendo pelo menos dois locais de li-
10 gação específicos para o antígeno CD19 e CD3, respectivamente. Ainda
proporcionados são polipeptídeos, em que o polipeptídeo acima descrito
compreende pelo menos um outro domínio, de preferência de função
predeterminada. Além disso, polinucleotídeos que codificam os referidos po-
lipeptídeos, bem como vetores compreendendo os referidos polinucleotídeos
15 e células hospedeiras transformadas com os mesmos e seu uso na produ-
ção dos referidos polipeptídeos são descritos. Além disso, composições, de
preferência composições farmacêuticas e diagnósticas, são proporcionadas
compreendendo qualquer um dos polipeptídeos, polinucleotídeos ou vetores
antes descritos. Também é descrito o uso dos polipeptídeos, polinucleotí-
20 deos e vetores antes mencionados para o preparo de composições farma-
cêuticas para imunoterapia, de preferência contra malignidades das células
B, tal como linfoma não-Hodgkin.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



711D934E092C16CB

Campo 2



84CD4A6BA7BA00EF

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P106615-List Seq.txt
- Data de Geração do Código: 06-01-2012
- Hora de Geração do Código: 15:58:56
- Código de Controle:
 - Campo 1: 711D934E092C16CB
 - Campo 2: 84CD4A6BA7BA00EF