(11) Número de Publicação: **PT 1175227 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/395 (2006.01) ***C07K 16/30*** (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01) ***C07K 14/47*** (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01) ***G01N 33/577*** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) ***A61K 47/48*** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2000.05.10**

(30) Prioridade(s): **1999.05.10 FR 9905942**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.01.30**

(45) Data e BPI da concessão: **2007.04.11**
039/2007

(73) Titular(es):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, RUE MICHEL ANGE 75016 PARIS CÉDEX FR

(72) Inventor(es):
FRANÇOIS HIRSCH FR
ERIC ANGEVIN FR

(74) Mandatário:
MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA
RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA AS CÉLULAS DO CARCINOMA RENAL HUMANO.**

(57) Resumo:
ANTICORPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA AS CÉLULAS DO CARCINOMA RENAL HUMANO.

DESCRIÇÃO

ANTICORPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA AS CÉLULAS DO CARCINOMA RENAL HUMANO

A presente invenção diz respeito a um novo hibridoma que produz um anticorpo monoclonal dirigido especificamente contra um antigénio do carcinoma de células renais humanas (RCC); a invenção também está relacionada com a utilização deste anticorpo monoclonal, em especial, para o diagnóstico, a imagiologia e o tratamento das RCC.

Os RCC são dos cancros particularmente difíceis de diagnosticar nas formas disseminadas (Oberling *et al.* (1960) Nature 186,402-403; Holthafer *et al.* (1983) Lab. Invest. 49,319-326) que representam, em cada ano, cerca de 5% dos novos casos de cancros. Com excepção da cirurgia de primeira intenção, não existe, actualmente, nenhum tratamento eficaz em caso de reincidência.

Um anticorpo monoclonal (mAb) específico do antigénio presente, de maneira predominante, unicamente sobre as células do carcinoma renal humano será extremamente útil para o diagnóstico, a localização e o tratamento desta doença. Um número limitado de mAb dirigidos contra os RCC humanos foi referido na literatura (Oosterwijk E *et al.* (1986) Int. J. Cancer 38: 489-494; Kinouchi T. *et al.* (1995) J.Urol. 154: 288-292; Kaufmann O *et al.* (1997) Histopathology 31: 31-37) ou são objecto de patentes ou de pedidos de patentes (EP 119 528, EP 160 250, EP 210 970, WO 88/08854, WO 90/14595).

Entre os anticorpos actualmente disponíveis, o anticorpo G250, por exemplo, não possui as qualidades necessárias para

o diagnóstico, para a imagiologia e/ou para a terapia. Assim o anticorpo G250 (WO 88/08854, inventores Oosterwijk E. e Warnaar S. O.), o mais estudado e o mais utilizado dos mAb dirigidos contra os RCC visto que foi utilizado em dois estudos clínicos de imunoradiolocalização de tumores primitivos ou metastizados (Oosterwijk E. *et al.* (1993) J. Clin. Oncol. 11: 738-750; Steffens M. G. *et al.* (1997) J. Clin. Oncol. 15: 1529-1537), não reconhecem 70 a 80% dos tumores. No entanto, até hoje não foi obtido nenhum efeito terapêutico com o anticorpo G250. Um outro limite de exploração deste anticorpo reside no facto de que os tumores humanos que exprimem o antigénio G250 muito dificilmente se podem desenvolver nos ratos, tornando difícil a realização de um bom modelo animal de selecção *in vivo*, via o mAb G250.

Estes resultados sublinham, assim, a necessidade de serem obtidos outros anticorpos monoclonais específicos de um antigénio diferente e que reconheçam de maneira altamente especifica os RCC sem apresentar uma reactividade substancial com as células normais.

Os inventores utilizaram a técnica dos hibridomas desenvolvida originalmente por Köhler e Milstein (Nature (1975) 256: 495497) para obter um novo hibridoma que produz um novo anticorpo monoclonal altamente especifico dos carcinomas renais humanos e que reconhece um antigénio especifico diferente do antigénio G250. A presente invenção tem por um objecto um hibridoma designado 5C5, tal como depositado em CNCM sob o numéro I-2184, formado pela fusão de células de uma linha de mieloma murino Balb/C Sp20 e de células de gânglios inguinais e abdominais de ratos Balb/C, que são previamente imunizados com a linha do carcinoma renal humano BIZ.

A presente invenção também diz respeito a um anticorpo monoclonal específico da maior parte das células dos carcinomas renais humanos chamado 5C5, que não se liga ao antigénio G250 e é susceptível de ser obtido através do hibridoma da invenção. O anticorpo monoclonal, assim produzido, foi isolado e em seguida caracterizado. A subclasse e o isotipo do anticorpo monoclonal foram determinados através da técnica de imunoprecipitação de Ouchterlony que utiliza os anticorpos de coelho dirigidos contra as subclasses de imunoglobulinas de ratos.

A caracterização do anticorpo monoclonal 5C5, da presente invenção, foi realizada sobre as linhas celulares de RCC bem como sobre os fragmentos tecidulares de pacientes que sofrem de RCC. A análise da presença do antigénio de células do carcinoma renal, especificamente reconhecido pelo anticorpo da presente invenção, pode ser realizada através das técnicas de imunohistoquímica usando, por exemplo, as colorações com a peroxidase ou através das técnicas de imunofluorescência. De acordo com um protocolo padrão, as lâminas sobre as quais são colocadas as secções geladas obtidas no criostato, as amostras não fixadas de biopsia são secas ao ar e depois encubadas com o anticorpo monoclonal 5C5 numa câmara húmida à temperatura ambiente. As lâminas são, de seguida, recobertas com uma preparação do anticorpo dirigida contra o anticorpo ou o fragmento do anticorpo da presente invenção. Por exemplo, se é utilizado o anticorpo monoclonal 5C5, o segundo anticorpo pode ser um anticorpo anti-ratos. O segundo anticorpo pode ser marcado com um composto fluorescente (fluoresceína, vermelho Texas, DAPI). A natureza ma marcação da amostra bem como a sua intensidade são, de seguida, determinadas com o auxilio de um microscópio de fluorescência. Nas experiências de imunofluorescência, o

anticorpo de acordo com a invenção caracteriza-se pelo referido anticorpo ou fragmento do anticorpo se ligar, de forma especifica, a um antigénio comum às células das linhas do carcinoma renal humano BIZ, HIEG, QUIE, BENA, PIUZ, GUIL, GUER, ROB, DURI, JOUS, GUIS, LEFR, MEGR, BLAN, DOBS, MOJ; o anticorpo monoclonal 5C5 não se liga a um antigénio das células da linha do carcinoma renal humano LAWR e não se liga ao antigénio G250.

A grande especificidade da reacção do anticorpo 5C5 foi demonstrada pela ausência de reactividade do anticorpo sobre as células das linhas tumorais humanos que não sejam linhas celulares do RCC. Assim o anticorpo monoclonal 5C5 não se liga a um antigénio de células de linhas de tumores do cólon humano: HRT18, HTL8R, LS174T, SW48, SW620, não se liga a um antigénio de células da linha do tumor do pulmão humano: LX2, não se liga a uma antigénio das células da linha de tumor do estômago humano: Kato, não se liga a um antigénio de células de linhas de tumores da mama humano: McF7 e ZR75, não se ligam a um antigénio das células da linha do tumor do ovário humano: OVCAR. Em relação à reactividade do anticorpo sobre as células normais, as experiências de imunohistoquímica relevaram uma marcação do anticorpo monoclonal 5C5 no citoplasma dos tubos renais próximos bem como no pólo apical e nas faces laterais das células epiteliais cólicas provenientes dos fragmentos tecidulares humanos normais.

A presente invenção também diz respeito ao anticorpo de cadeia simples produzido a partir do anticorpo monoclonal de acordo com a invenção, ao anticorpo quimérico produzido a partir do anticorpo monoclonal de acordo com a invenção e também ao anticorpo humanizado produzido a partir do anticorpo monoclonal de acordo com a invenção.

O anticorpo ou o fragmento do anticorpo dirigido contra o antigénio do carcinoma das células renais humanas pode ser administrado para provocar uma resposta imune anti-idiotípica ou anti-anti-idiotípica. Um anticorpo anti-idiotípico dirigido contra o anticorpo reage contra um antigénio do carcinoma de células renais humanas pode, com efeito, exprimir os epitopos similares aos do antigénio e pode, assim, ser utilizado de forma semelhante para a imunização e assim para desenvolver uma resposta imune anticancerosa. Um anticorpo anti-anti-idiotípico pode ser utilizado em exames semelhantes aos descritos para o anticorpo primário antitumor da presente invenção. Como consequência, é igualmente entendido pela invenção a utilização de um anticorpo anti-idiotípico caracterizado por se dirigir contra os anticorpos de acordo com a invenção e a utilização de um anticorpo anti-anti-idiotípico caracterizado por se dirigir contra o anticorpo anti-idiotípico precedente.

A invenção também diz respeito a um fragmento de anticorpo de acordo com a invenção caracterizado por poder ser utilizado em vez de anticorpo inteiro. Num modo de realização preferido, este fragmento do anticorpo é um fragmento F(ab')2, um fragmento Fab' ou um fragmento Fv.

Um outro modo de realização preferido da invenção diz respeito a um agente de diagnóstico do carcinoma das células renais humanas caracterizado por compreender um anticorpo ou um fragmento de anticorpo de acordo com a invenção tal como descrito anteriormente. De acordo com um modo de realização preferido, o agente de diagnóstico caracteriza-se pelo anticorpo ou pelo fragmento do anticorpo ser marcado directamente ou indirectamente através de um marcador gerador de sinal; este marcador é seleccionado entre os isótopos

radioactivos e as entidades não isotópicas; as entidades não isotópicas são seleccionadas entre as enzimas, os corantes, os haptenos, os agentes luminescentes tal como os agentes radioluminescentes, quimiluminescentes, bioluminescentes, fluorescentes, fosforescentes, os ligandos tal como a biotina, a avidina, a estreptavidina, a digoxigenina.

De acordo com um modo de realização, o agente de diagnóstico de acordo com a invenção caracteriza-se pelo anticorpo ou o fragmento de anticorpo estar acoplado a um suporte sólido directamente ou indirectamente através de um braço de espaçamento. O agente de diagnóstico da invenção pode ser utilizado num método de diagnóstico dos RCC humanos *in vitro* que compreende a colocação em contacto de uma amostra de fluido corporal e/ou de tecido corporal proveniente de um paciente, no qual se suspeita a presença de um cancro, com um agente de diagnóstico, tal como descrito anteriormente, e a determinação da presença de um antigénio ou de um anticorpo anti-idiotípico ou de um anticorpo de acordo com a invenção. A invenção também diz respeito a um *kit* de diagnóstico caracterizado que contém o agente de diagnóstico descrito anteriormente.

A invenção também diz respeito a uma composição para a detecção, a localização e a imagiologia do carcinoma de células renais, que compreende um anticorpo ou um fragmento de um anticorpo de acordo com a invenção; as vantagens da utilização de fragmentos do anticorpo F(ab) ou F(ab)2' para a detecção, a localização e a imagiologia foram descritas por Goldenberg D. M. (Patente US 4 331 647). O anticorpo ou o fragmento de anticorpo, de acordo com a invenção, é marcado directamente ou indirectamente com um marcador gerador de sinal seleccionado entre os isótopos radioactivos e as

entidades não isotópicas. Os radioisótopos emissores de raios X, de raios gama, de positrão e de fluorescência são os mais apropriados como marcador dos agentes de diagnóstico de acordo com a invenção; como radioisótopos que podem ser utilizados para marcar o agente de diagnóstico, podem citar-se o :Iodo^{123}, Iodo^{125}, Iodo^{126}, Iodo^{131}, Iodo^{133}, Bromo^{77}, Tecnécio^{99m}, Indio^{111}, Indio^{113m}, Gálio^{67}, Gálio^{68}, Ruténio^{95}, Ruténio^{97}, Ruténio^{103}, Ruténio^{105}, Mercúrio^{107}, Mercúrio^{203}, Rénio^{99m}, Rénio^{101}, Rénio^{105}, Escândio^{47}, Telúrio^{121m}, Telúrio^{122m}, Telúrio^{125m}, Tulio^{165}, Túlio^{167}, Túlio^{168}, Cobre^{67}, Flúor^{18}, Ítrio^{90}, Ítrio^{199}, Paládio^{100}, Bismuto^{217}, Antimónio^{211}. Existe uma variedade de métodos conhecidos do perito para engatar os radioisótopos às proteínas quer directamente quer através de um agente quelante tal como o DTPA (ácido dietileno triaminopentacético). Todos estes métodos podem ser utilizados para marcar os anticorpos ou fragmentos de anticorpos da presente invenção. Por exemplo o anticorpo monoclonal pode ser marcado com Na[I^{125}] através do método com a cloramina T. [Hunter W. M. e Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495]. O anticorpo ou o fragmento de anticorpo pode ser directamente marcado através de Tecnécio^{99m} pela técnica de Crockford *et coll.* (patente US 4 424 200) ou ligado através de DTPA como descrito por Hnatowich (patente US 4 479 930). As entidades não isotópicas são seleccionadas entre as enzimas, os corantes os haptenos, os agentes luminescentes tal como os agentes radioluminescentes, quimiluminescentes, bioluminescentes, fluorescentes, fosforescentes, os ligandos tal como a biotina, a avidina, a estreptavidina, a digoxigenina.

A invenção também diz respeito a um método de detecção, de localização e de imagiologia do carcinoma de células renais, que compreende as seguintes etapas (i) de injecção parenteral

num ser humano de um anticorpo ou de um fragmento de anticorpo de acordo com a invenção, ou de uma composição tal como descrito acima; (ii) de acumulação após um período de tempo suficiente, ao nível do local do carcinoma de células renais, do anticorpo marcado ou do fragmento de anticorpo marcado sem que o anticorpo ou o fragmento de anticorpo não se ligue de forma substancial às células normais; e (iii) de detecção do sinal através de um detector de sinal e depois (iv) de conversão do sinal numa imagem do carcinoma de células renais. No quadro de uma marcação com um radioisótopo, o detector de sinal utilizado é, de preferência, um equipamento convencional tal como uma câmara gama.

A invenção inclui também uma composição farmacêutica destinada ao tratamento do carcinoma renal humano que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ou de um fragmento de anticorpo, de acordo com a invenção, e um veículo farmacologicamente aceitável. O veículo farmacologicamente aceitável pode ser qualquer tipo de veículo utilizado habitualmente na preparação de composições injectáveis, o que quer dizer um diluente, um agente de suspensão tal como uma solução salina isotónica ou tamponada.

O anticorpo e/ou fragmento de anticorpo, de acordo com a invenção, podem ser utilizados como medicamento; de acordo com um modo de realização preferido, o anticorpo e/ou fragmento de anticorpo de acordo com a invenção são usados como medicamento para o tratamento do carcinoma de células renais humanas; para este efeito, os anticorpos ou o fragmento dos anticorpos da composição farmacêutica são conjugados através de um agente seleccionado entre o grupo de

agentes antiproliferativos, antineoplásticos ou citotóxicos. Estes agentes são os radioisótopos ou as entidades não isotópicas.

Num modo de realização preferido, o agente antiproliferativo e/ou antineoplástico e/ou citotóxico não isotópico é uma molécula de ácido nucleico. Esta molécula de ácido nucleico pode ser de ADN de cadeia simples, de ADN de cadeia dupla, de ARN de cadeia simples, de ARN de cadeia dupla, um híbrido ARN/ADN. De acordo com um modo de realização preferido, a molécula de ácido nucleico é de ADN de cadeia dupla ou de ARN de cadeia simples que codifica para um produto proteico de interesse que se exprime, de forma eficaz, na célula. Os produtos proteicos de interesse são escolhidos de um grupo composto das interleucinas, das citoquinas, das linfoquinas, das quemoquinas, dos factores de crescimento, das proteínas citotóxicas, das proteínas que permitem elevar a quimioresistência e das enzimas de restrição; as interleucinas, as citoquinas, as linfoquinas e as quemoquinas são escolhidas de um grupo composto de preferência das interleucinas Il-1, Il-4, Il-5, Il-6,Il-7, Il-8, Il-9, Il-10, Il-11, Il-13, Il-12, Il-14, Il-15, Il-16, Il-17 e Il-18, dos interferões α-IFN, β-IFN e γ-IFN; de preferência, o produto proteico de interesse é a interleucina 2.

De acordo com um outro modo de realização da invenção, a molécula de ácido nucleico é um ARN antisense.

A conjugação do anticorpo ou do fragmento de anticorpo, da presente invenção, com um agente antiproliferativo, antineoplástico ou citotóxico tal como descrito acima pode ser utilizada em terapia genética. De acordo com um outro modo de realização, a conjugação do anticorpo ou do fragmento

de anticorpo da presente invenção com um agente antiproliferativo, antineoplástico e citotóxico pode ser utilizado para parar o desenvolvimento dos RCC e para induzir uma regressão e/ou uma eliminação da massa tumoral. De preferência, o anticorpo ou o fragmento de anticorpo assim conjugado é introduzido no paciente que sofre de RCC e distribuído nos locais tumorais por via oral ou parenteral num líquido transportador farmacologicamente aceitável tal como uma solução de sal fisiológico. Alternativamente, uma solução ou uma suspensão de anticorpo ou de fragmento de anticorpo conjugado com um agente que pode fazer uma perfusão directamente num tecido epitelial maligno, este método é utilizado, de preferência, no caso em que o RCC não está metastizado.

Os radioisótopos preferidos conjugados aos anticorpos monoclonais utilizados para a terapia são os radioisótopos emissores de raios gama e, de preferência, o $Iodo^{131}$, o $Ítrio^{90}$, o $Ouro^{199}$, o $Paládio^{100}$, o $Cobre^{67}$, o $Bismuto^{217}$ e o $Antimónio^{211}$. Os radioisótopos emissores de raios beta e alfa também podem ser utilizados para a terapia. As entidades não isotópicas conjugadas aos anticorpos monoclonais utilizados para a terapia são múltiplos e variados; podem citar-se: (i) os antimetabolitos tal como os agentes anti-folato, o metotrexato, (ii) os análogos das purinas e das pirimidinas (mercaptopurina, fluorouracilo, 5-azacitidina), (iii) os antibióticos, (iv) as lectinas (ricina, abrina) e (iv) as toxinas bacterianas (toxina diftérica).

O anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a invenção, também é utilizado como agente de selecção. Permite assim seleccionar as células citotóxicas tal como as células T humanas, os monócitos ou as células NK sobre o local do

tumor metastizado ou não. As células citotóxicas podem estar ligadas ao anticorpo através do receptor Fc situado na superfície destas células ou através de um anticorpo intermediário que apresente uma especificidade dupla por exemplo; estes anticorpos bioespecíficos para a selecção dos carcinomas de células renais podem ser produzidos associando uma célula imunitária que produz o anticorpo da presente invenção ou o hibridoma da presente invenção com uma célula que produz um anticorpo dirigido contra a célula citotóxica a seleccionar. Os anticorpos bioespecíficos podem, também, ser produzidos por ligação química de dois anticorpos que possuem a especificidade desejada. O anticorpo ou fragmento de anticorpo, de acordo com a invenção, permite também seleccionar os veículos de distribuição dos agentes antiproliferativos, antineoplásticos ou citotóxicos sobre o local do tumor metastizado ou não. Por veiculos de distribuição pretende-se designar os liposomas e as partículas virais.

Por fim, de acordo com um outro modo de realização preferido, o anticorpo anti-idiotípico, de acordo com a invenção, pode ser utilizado para a preparação de um tratamento profiláctico destinado ao tratamento do carcinoma humano. Com efeito, o anticorpo anti-idiotipo que é especificamente reconhecido pelo anticorpo ou fragmento de anticorpo de acordo com a invenção pode ser usado para a imunização de modo a provocar uma resposta imune anti-cancerosa no organismo.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1: Tipagem das linhas celulares de RCC em imunofluorescência indirecta por citometria em fluxo. Figura 1A: tipagem das linhas PIUZ e LAWR; figura 1B: tipagem das linhas DOBS e GUIL.

Figura 2: Evidência da internalização do anticorpo 5C5 numa linha RCC.

As células do carcinoma renal ROB foram incubadas com 5C5 conjugado com fluoresceína (FITC) (A, C, E) e da transferrina conjugada com Vermelho-Texas (TRIC) (B, D, F). A 4 °C, o 5C5 marca a superfície celular (A). Após 10 minutos (C, D) e 30 minutos (E, F) de internalização, o 5C5 (C, E) e a transferrina (D, F) são internalizadas e são parcialmente co-distribuídos na região perinuclear onde está localizado o compartimento de reciclagem tardia da transferrina.

Figura 3: Produção de interleucina 2 (I1-2) de ratos pelas células ROB após transfecção.

Figura 4: Expressão da β-galactosidase nos RCC *in vivo*, após antifecção intravenosa de um conjugado 5C5-benzoquinona-ADN.

Um tumor carcinoma renal (HIEG) foi enxertado sob a pele de ratos Nude irradiados. Os ratos receberam secundariamente por via intravenosa ADN complementar que codifica a β-galactosidase bacteriana, sozinho (Controlo) ou o mesmo ADN conjugado com 5C5, através de uma ligação fazendo intervir a benzoquinona. A produção da β-galactosidase foi colocada em evidência por uma marcação em imunofluorescência com o auxílio de um anticorpo biotinilado dirigido contra a β-galactosidase (laboratório Sigma), depois revelada com o auxílio da estreptavidina FITC (b-Gal). Os núcleos das células do tumor são visualizadas com o auxílio de DAPI e as células são colocadas em evidência por contraste de fase (C-fase). A β-galactosidase não é detectada nas células tumorais quando os ratos receberem o ADN conjugado com 5C5.

Figura 5: Expressão da β-galactosidase nos RCC *in vivo*, após antifecção intravenosa de um conjugado 5C5-avidina-poliLisina-toxina ADN.

Um tumor de carcinoma renal (HIEG) foi enxertado sob a pele de ratos Nude irradiados. Os ratos receberam secundariamente

por via intravenosa ADN complementar que codifica a β-galactosidase bacteriana, sozinho (controlo) ou o mesmo ADN associado a um complexo avidina polilisina (via a benzoquinona) ao qual está agarrado o 5C5 biotinilado (mAbAv-Pl) ou o mesmo complexo compreende como suplemento a toxina bacteriana de hemaglutinina biotinilada e permite aumentar a eficácia de transferência de gene (id +Tox). A produção de β-galactosidase foi determinada através da marcação em imunofluorescência com o auxílio de um anticorpo biotinilado dirigido contra a β-galactosidase (laboratório Sigma) depois revelada com o auxílio da estreptavidina FITC (β-galactosidase). As células são colocadas em evidência por contraste de fase (Contraste de fase). A β-galactosidase não é detectada nas células tumorais quando os ratos receberam o ADN conjugado a 5C5.

As outras características e as vantagens da presente invenção surgirão com a leitura dos seguintes exemplos.

EXEMPLOS

1. Protocolo de preparação de hibridoma 5C5

Dois ratos Balb/C receberam uma injecção intraplantar de $4,5x10^6$ células do carcinoma renal humano BIZ fornecido pelo Dr Jean Gogusev (Hospital Necker-Enfants Malades, Paris, França) em 100 µl de NaCl 0,9%.

Dezoito horas mais tarde, realiza-se uma repetição com $5x10^6$ células do carcinoma renal humano BIZ em 50 µl de NaCl 0,9%. Três dias mais tarde, realizou-se uma suspensão celular a partir dos gânglios inguinais e abdominais dos ratos.
$23x10^6$ células da suspensão celular são associadas com $11,5x10^6$ células de mieloma de ratos Balb/C Sp20, na presença

de PEG4000. A mistura celular foi, de seguida, depositadas em três placas de 96 poços preenchidos dois dias antes com as células peritoneais de ratos, de modo a se seleccionar apenas as células híbridas são capazes de se desenvolver.

Uma primeira análise por citometria em fluxo sobre células BIZ originou resultados positivos para o clone 5C5.

Uma segunda análise permitiu confirmar este resultado positivo.

As ampolas 5C5 não clonadas puderam assim ser congeladas.

Uma diluição limite a partir de uma ampola descongelada do clone 5C5 permitiu obter, após análise por citometria em fluxo sobre células BIZ, um subclone 5C5. O hibridoma 5C5 pode assim ser congelado. A determinação da classe e da subclasse de anticorpo monoclonal 5C5 foi realizada com o auxílio de imunosoro de coelho específicos, de acordo com a técnica de Ouchterlony no Laboratório de Imunologia Experimental (colaboração do Professor H. BAZIN).

O anticorpo monoclonal 5C5 pertence à classe das imunoglobulinas IgG1k.

2. Caracterização do anticorpo monoclonal 5C5:

2.1. Sobre os RCC

Dezassete linhas de RCC humanas foram testadas por imunofluorescência indirecta, por citometria em fluxo, com o auxílio do mAb 5C5, seja a partir de sobrenadantes de cultura, seja a partir de mAb imunopurificado sobre a colónia de proteína-A-Sepharose®. As 17 linhas RCC humanas testadas

são as seguintes: BIZ, HIEG, QUIE, BENA, PIUZ, GUIL, GUER, ROB, DURI, JOUS, GUIS, LEFR, MEGR, BLAN, DOBS, MOJ, LAWR. Apenas LAWR não é reconhecida pelo anticorpo monoclonal 5C5 (Figura 1).

Um estudo paralelo realizado em presença do anticorpo G250 sobre o conjunto destes tumores mostrou que as linhas BIZ e HIEG não exprimem o anticorpo G250 enquanto que as linhas ROB e QUIE exprimem (resultados não mostrado).

2.2. Sobre outras linhas

O anticorpo monoclonal 5C5 foi testado sobre diversas linhas tumorais humanas por imunofluorescência indirecta em microscopia (colaboração com o Doutor J. LEPENDU, INSERM U 419, NANTES, FRANÇA). As linhas testadas são as seguintes: HRT18, HLT8R, LS174T, SW48 e SW620 derivadas do tumor do cólon, LX2 derivada do tumor do pulmão, KATO derivada do cancro do estômago, MCF7 e ZR75 derivadas do cancro da mama e OVCAR derivada de um tumor do ovário. Todas estas experiências de imunofluorescência indirecta utilizam o anticorpo monoclonal 5C5 sobre estas linhas tumorais humanas revelaram-se negativas (resultados não mostrados).

3. Utilização do anticorpo monoclonal 5C5 em terapia genética *in vitro*:

As experiências de imunofluorescência demonstraram que o anticorpo monoclonal 5C5 se internaliza perfeitamente nos RCC (Figura 2). Este resultado positivo constitui um preliminar indispensável a uma aproximação vectorial tal como **antifecção** [Poncet *et al.* (1996) Gene Ther. 3: 731-738].

As experiências de antifecção permitiram demonstrar que o anticorpo monoclonal 5C5 está apto a veicular um gene que codifica para a interleucina-2 de ratos (I1-2) nas células; o gene de Il-2 murino assim veiculado está transcrito e expresso como demonstra a presença de Il-2 nos sobrenadantes da cultura (Figura 3).

4. Utilização de AcM 5C5 em terapia genética *in vivo*

Estas experiências foram realizadas em colaboração com E. Angevin (I. G. R.).

4.1. 1ª Experiência

Os ratos Nude previamente irradiados receberam um enxerto de tumor HIEG em posição subcutânea. Quando os tumores atingem um tamanho de cerca de 10 x 10 mm, os ratos são repartidos em três grupos:

* 1 ratos naturais
* 2 ratos recebem por via intravenosa retro-orbital, uma injecção de uma mistura de 10 µg de mAb 5C5 acoplado a 100g de plasmídeo que codifica para a β-galactosidase por intermédio da benzoquinona, de acordo com a técnica descrita precedentemente [Poncet *et al.* (1996) Gene Ther. 3: 73738].

Uma vez que nenhuma actividade enzimática foi reencontrada no tumor dos ratos naturais, 2 dos 3 ratos que receberam o conjugado apresentam uma marcação positiva (Figura 4). Um estudo mais exaustivo introduzido na investigação da actividade enzimática demonstrou para os 2 ratos positivos, a sua ausência nos outros órgãos testados e uma positividade importante no fígado dos ratos negativos.

4.2. 2ª Experiência

Os ratos Nude previamente irradiados receberam um enxerto de um tumor HIEG em posição subcutânea. O anticorpo monoclonal 5C5 previamente biotinilado é acoplado a um complexo que inclui vários componentes, ADN=poli-L-lisinas=benzoquinona=biotina através de uma molécula de avidina. Por fim, é adicionada uma molécula de exotoxina A de Pseudomonas *aeruginosa* biotinilada. Procura-se uma actividade delatora da medida da expressão da β-galactosidase os tumores. Uma actividade forte da β-galactosidase foi colocada em evidência no grupo de ratos que receberam o conjugado completo (Figura 5).

REFERÊNCIAS

Holthafer *et al.* (1983) Lab. Invest. 49, 319-326.

Hunter W. M. e Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495.

Kaufmann O. *et al.* (1997) Histopathology 31: 31-37.

Kinouchi T. *et al.* (1995) J. Urol. 154: 288-292.

Köhler e Milstein (Nature (1975) 256: 495-497.

Oberling *et al.* (1960) Nature 186, 402-403.

Oosterwijk E. *et al.* (1993) J. Clin. Oncol. 11: 738-750.

Oosterwijk E *et al.* (1986) Int. J. Cancer 38: 489-494.

Poncet *et al.* (1996) Gene Therapy 3: 731-738.

Steffens M. G. *et al.* (1997) J. Clin. Oncol. 15: 1529-1537.

06-07-2007

REIVINDICAÇÕES

1. Hibridoma designado 5C5, tal como depositado em CNCM sob o Nº 1-2184, formado pela fusão de células de uma linha de mieloma murino Balb/C Sp20 e de células de gânglios inguinais e abdominais de ratos Balb/C, que são previamente imunizados com a linha do carcinoma renal humano BIZ.

2. Anticorpo monoclonal5C5 especifico da maior parte das células de carcinomas renais humanos, que não se liga ao antigénio G250 e é susceptível de ser obtido através do hibridoma da reivindicação 1.

3. Anticorpo de cadeia simples produzido a partir do anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 2.

4. Anticorpo quimérico produzido a partir do anticorpo de acordo com a reivindicação 2 ou 3.

5. Anticorpo humanizado produzido a partir do anticorpo de acordo com a reivindicação 2 ou 3.

6. Anticorpo anti-idiotípico caracterizado por ser dirigido contra o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5.

7. Anticorpo anti-anti-idiotípico caracterizado ser dirigido contra o anticorpo anti-idiotípico de acordo com a reivindicação 6.

8. Fragmento de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7 caracterizado por conservar a especificidade do referido anticorpo.

9. Fragmento de acordo com a reivindicação 8 caracterizado por se tratar de um fragmento F(ab')2, de um fragmento Fab', ou de um fragmento Fv.

10. Agente de diagnóstico do carcinoma de células renais humanas caracterizado por compreender um anticorpo de acordo com uma das reivindicações 2 a 7 ou um fragmento de anticorpo de acordo com as reivindicações 8 e 9.

11. Agente de diagnóstico de acordo com a reivindicação 10 caracterizado pelo anticorpo ou fragmento de anticorpo ser marcado directamente ou indirectamente com um marcador gerador de sinal.

12. Agente de diagnóstico de acordo com a reivindicação 11 caracterizado pelo marcador ser seleccionado entre os isótopos radioactivos e as entidades não isotópicas.

13. Agente de diagnóstico de acordo com a reivindicação 12 caracterizado pelas entidades não isotópicas serem seleccionadas entre as enzimas, os corantes, os haptenos, os agentes luminescentes tal como os agentes radioluminescentes, quimiluminescentes, bioluminescentes, fluorescentes, fosforescentes, os ligandos tal como a biotina, a avidina, a estreptavidina, a digoxigenina.

14. Agente de diagnóstico de acordo com a reivindicação 13 caracterizado pelo anticorpo ou fragmento de anticorpo estar acoplado a um suporte sólido directamente ou indirectamente através de um braço de espaçamento.

15. Método de diagnóstico *in vitro* do carcinoma renal humano, que compreende:

- (i) a colocação em contacto de uma amostra de fluido corporal e/ou de tecido corporal proveniente de um paciente, no qual se suspeita a presença de um cancro, com um agente de diagnóstico de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15; e
- (ii) a determinação da presença de um antigénio de células do carcinoma renal humano susceptível de ser reconhecido por um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5 u 7, ou por um fragmento de anticorpo anti-idiotípico de acordo com a reivindicação 6, ou da presença de um anticorpo de acordo com as reivindicações 2 a 5 ou 7.

16. Kit de diagnóstico caracterizado por conter um agente de diagnóstico de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 14.

17. Composição para a detecção, a localização e a imagiologia do carcinoma de células renais, que compreende um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5 ou 7, ou um fragmento de anticorpo de acordo com as reivindicações 8 ou 9, de modo que o anticorpo ou o fragmento de anticorpo é marcado directamente ou indirectamente com um marcador gerador de sinal.

18. Composição de acordo com a reivindicação 17 caracterizada pelo marcador gerador de sinal ser seleccionado entre os isótopos radioactivos e as entidades não isotópicas.

20. Composição de acordo com a reivindicação 19 caracterizada pelos isótopos radioactivos serem seleccionados entre o grupo composto pelo Iodo^{123}, Iodo^{125}, Iodo^{131}, Índio^{111}, o Ruténio^{97}, o Cobre^{67} ou o Tecnécio^{99m} e pelas entidades não isotópicas serem seleccionadas entre as enzimas, os corantes, os haptenos, os

agentes luminescentes tal como os agentes radioluminescentes, quimiluminescentes, bioluminescentes, fluorescentes, fosforescentes, os ligandos tal como a biotina, a avidina, a estreptavidina, a digoxigenina.

20. Utilização de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5 ou 7 ou de um fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 ou 9 ou de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19 para a preparação de uma composição destinada à detecção, à localização e à imagiologia do carcinoma das células renais.

21. Composição farmacêutica destinada ao tratamento do carcinoma renal humano que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 7 ou de um fragmento de anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9 e um veiculo farmacologicamente aceitável.

22. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7 e/ou fragmento de anticorpo de acordo com uma das reivindicações 8 e 9 como medicamento.

23. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 7 e/ou fragmento de anticorpo de acordo com uma das reivindicações 8 e 9 como medicamento para o tratamento do carcinoma das células renais humanas.

24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 21 caracterizada pelo referido anticorpo ou fragmento de anticorpo ser conjugado a pelo menos um agente seleccionado

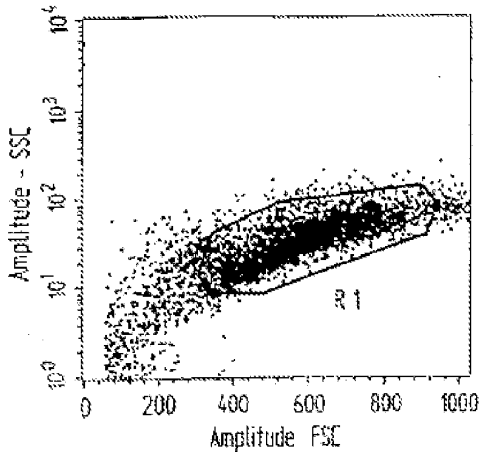
entre o grupo dos agentes antiproliferativos, antineoplásticos ou citotóxicos.

25. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 24 caracterizada pelo referido agente ser um isótopo radioactivo escolhido entre o grupo: o Iodo^{131}, o Ítrio^{90}, o Ouro^{199}, o Paládio^{100}, o Cobre^{67}, o Bismuto^{217} e o Antimónio^{211}.

26. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 5 ou 7, ou fragmento de anticorpo de acordo com a reivindicação 8 ou 9, na qualidade de agente de selecção.

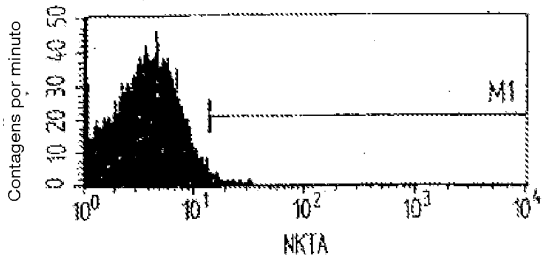
27. Utilização de um anticorpo anti-idiotípico de acordo com a reivindicação 6 para a preparação de uma composição profiláctica destinada ao tratamento do carcinoma humano.

06-07-2007

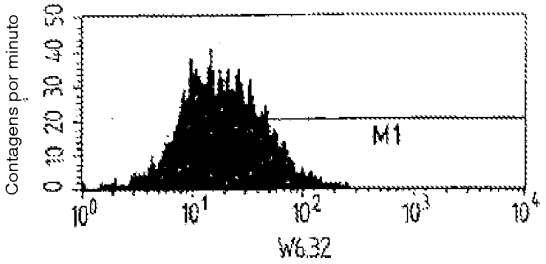


TIPAGEM RCC

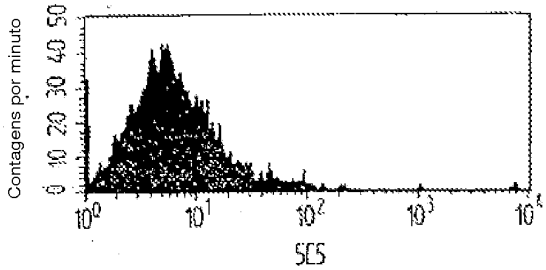
RCC PIUZ



Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5767	100,00	78,18	4,02
M1	37	0,64	0,50	17,70

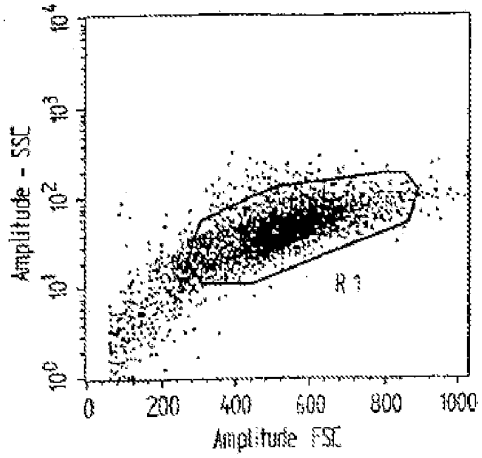


Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5832	100,00	75,65	24,13
M1	3543	60,75	45,96	33,97



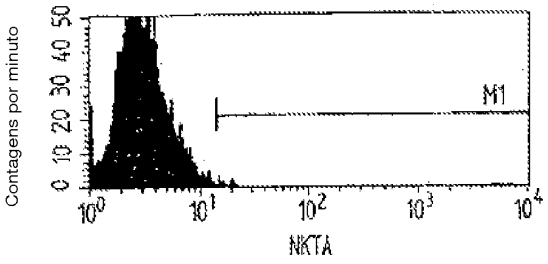
Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5829	100,00	78,59	10,52
M1	870	14,93	11,73	38,21

FIG_1A...

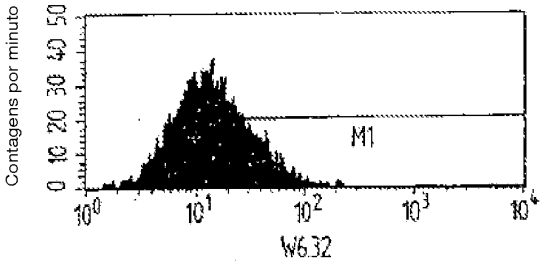


TIPAGEM RCC

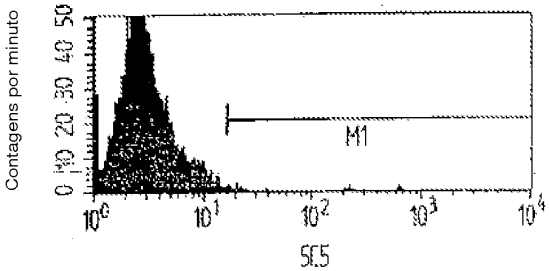
RCC LAWR



Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5447	100,00	89,59	3,13
M1	5	0,09	0,08	16,09

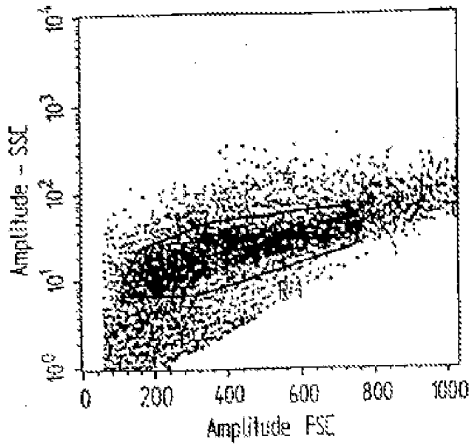


Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5350	100,00	90,02	17,06
M1	2377	44,43	40,00	28,03



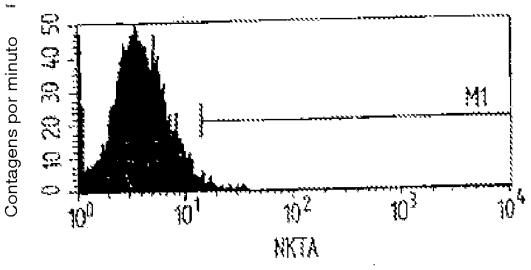
Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5293	100,00	91,48	3,16
M1	39	0,74	0,67	43,53

FIG_1A

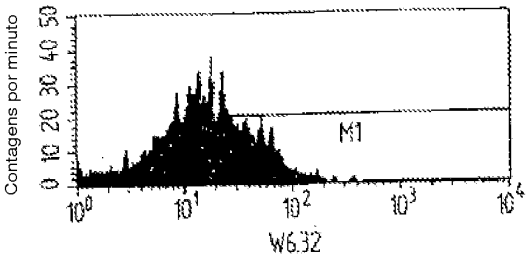


TIPAGEM RCC

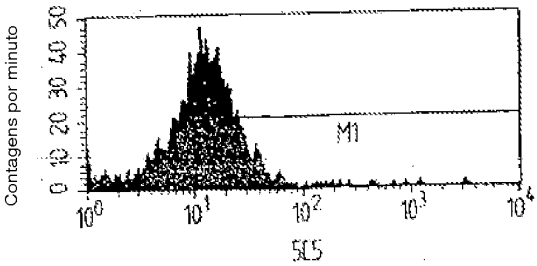
RCC DOBS



Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5363	100,00	55,68	4,12
M1	37	0,69	0,38	16,64

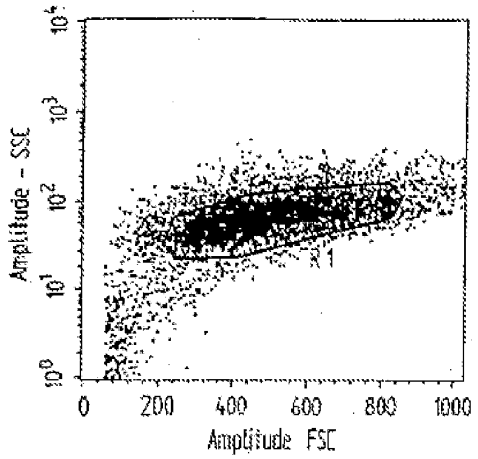


Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	4908	100,00	49,39	22,31
M1	2644	53,87	26,61	34,74



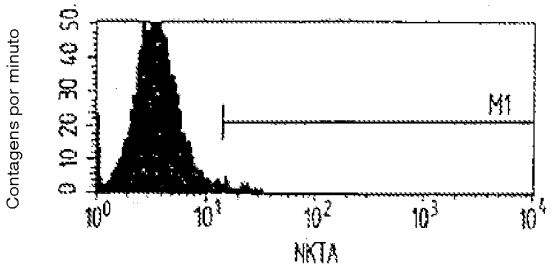
Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5207	100,00	51,60	14,60
M1	1912	36,72	18,95	25,47

FIG_1B...

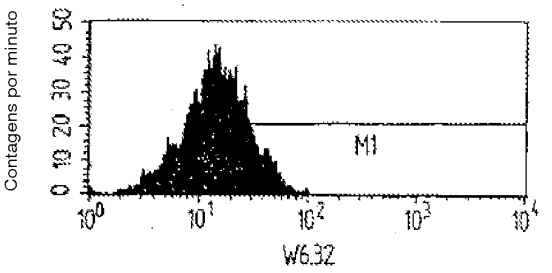


TIPAGEM RCC

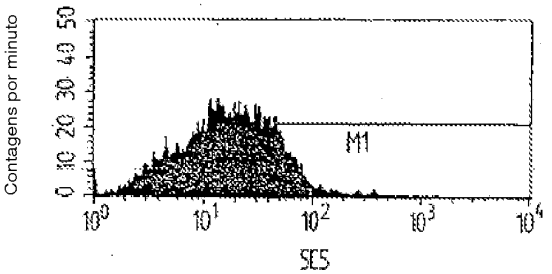
RCC GUIL



Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5088	100,00	73,53	3,64
M1	32	0,63	0,46	18,46



Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5079	100,00	71,90	16,02
M1	2525	49,71	35,74	23,29



Marcador	Aconteci-mentos	%Selecção	%Total	Média
Todos	5085	100,00	74,01	22,66
M1	2971	58,43	43,24	33,40

FIG_1B

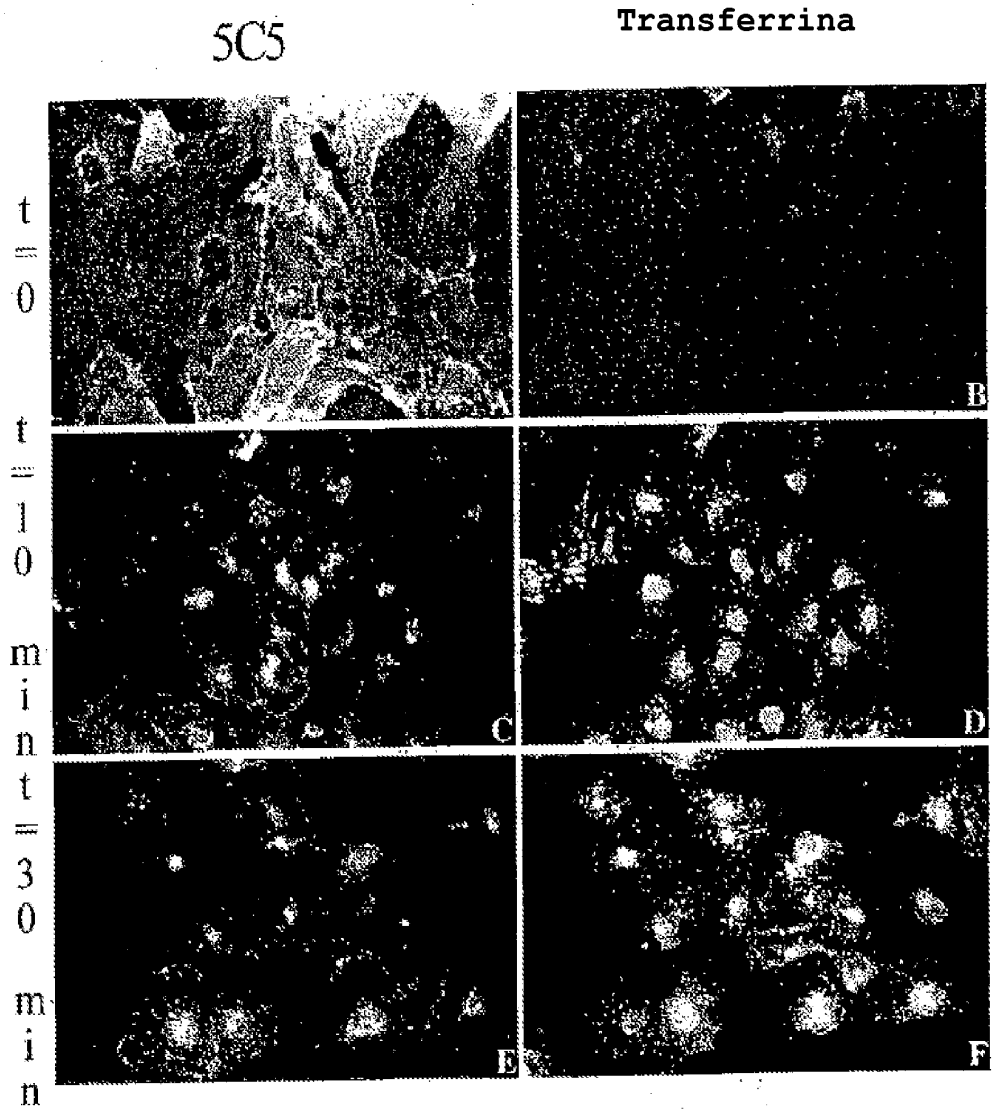
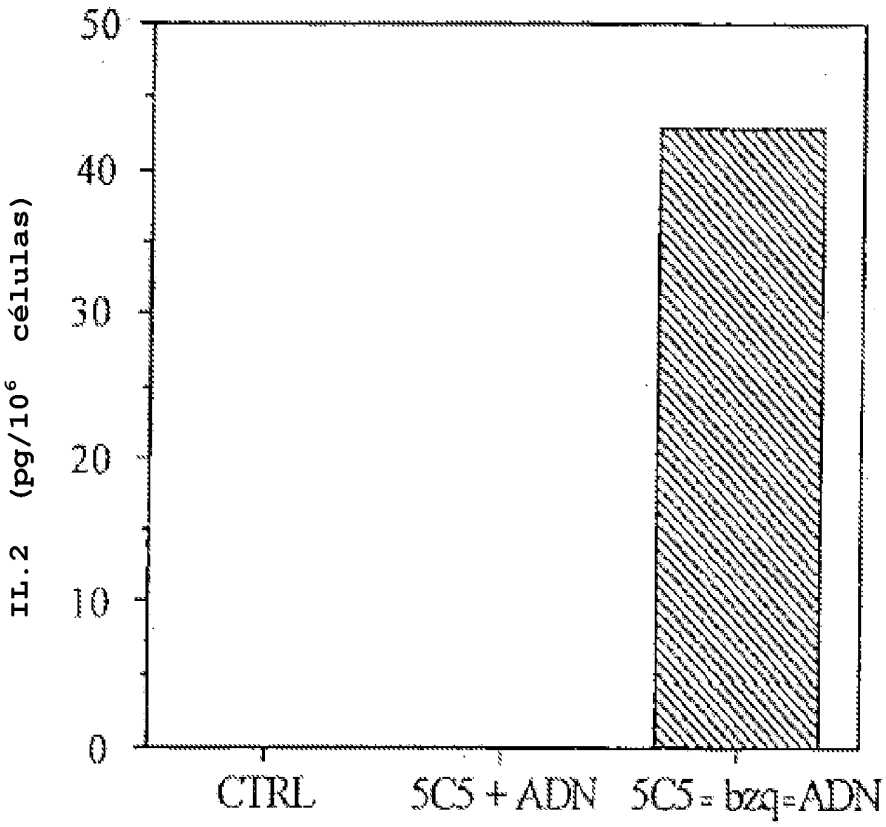


FIG.2

FIG_3



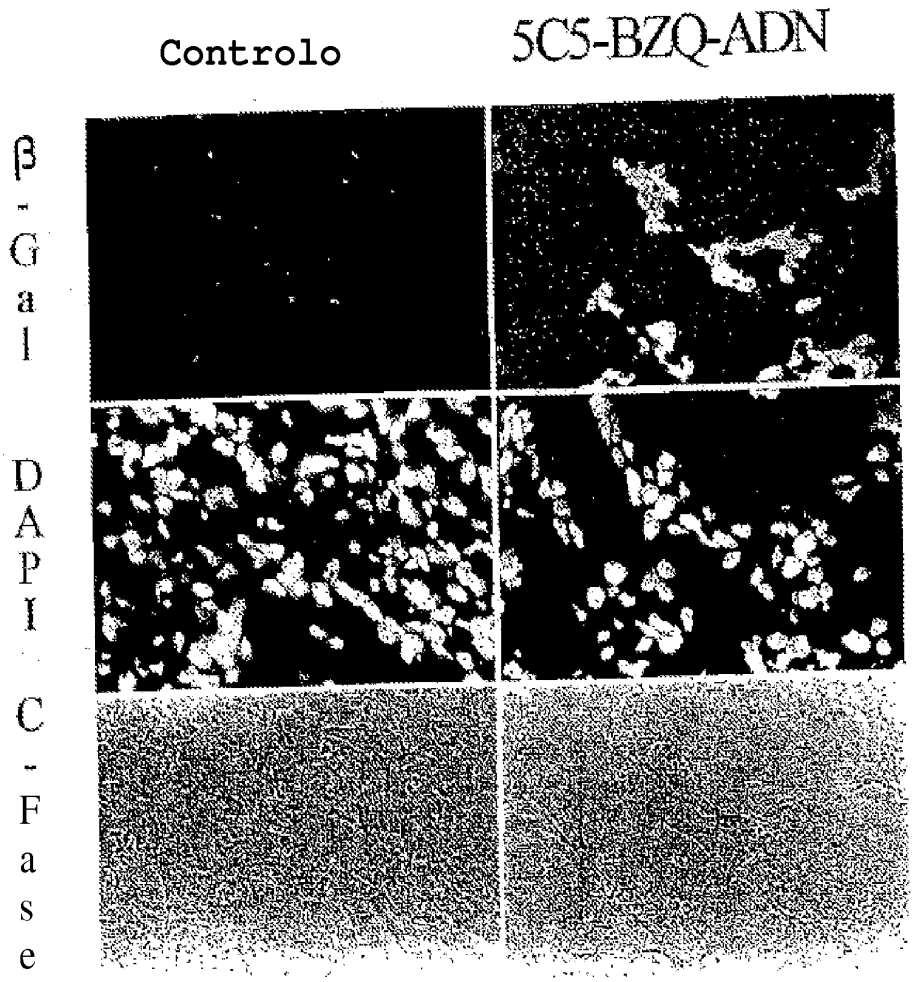


FIG.4

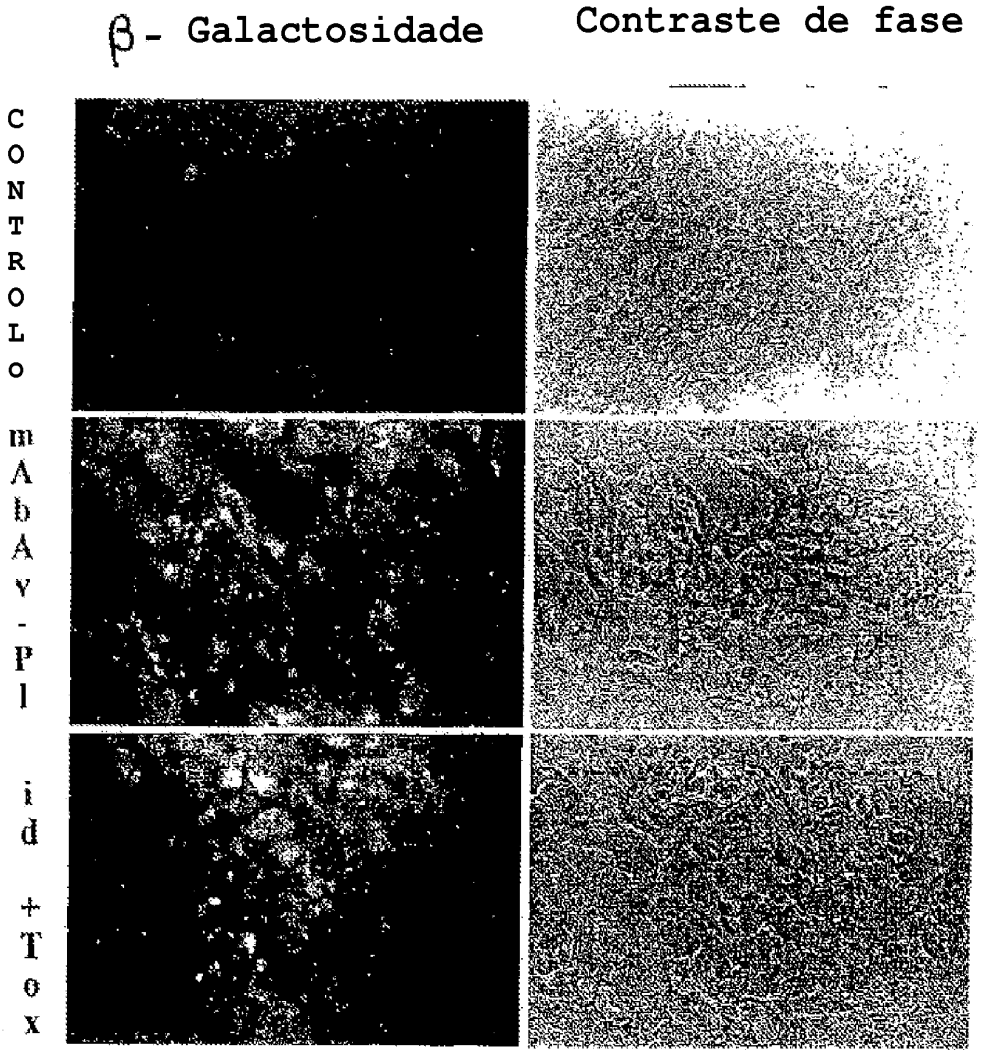


FIG.5