

(11) Número de Publicação: **PT 1194167 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/395 (2007.10) **C07K 16/28** (2007.10)
C07K 19/00 (2007.10) **A61P 37/06** (2007.10)
C07K 14/55 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2000.06.09**

(30) Prioridade(s): **1999.06.09 US 138284 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.04.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.08.19**
206/2009

(73) Titular(es):

IMMUNOMEDICS, INC.
300 AMERICAN ROAD MORRIS PLAINS, NJ
07950 **US**

(72) Inventor(es):

DAVID M. GOLDENBERG **US**
HANS J. HANSEN **US**

(74) Mandatário:

JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
R DO SALITRE 195 RC DTO 1250-199 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **IMUNOTERAPIA DE DOENÇAS AUTO-IMUNITÁRIAS UTILIZANDO ANTICORPOS QUE TÊM COMO ALVO CÉLULAS B**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"IMUNOTERAPIA DE DOENÇAS AUTO-IMUNITÁRIAS UTILIZANDO ANTICORPOS QUE TÊM COMO ALVO CÉLULAS B"

Campo da invenção

A presente invenção diz respeito à utilização de um anticorpo LL2 "naked" (não conjugado) na preparação de um medicamento. O anticorpo administra-se individualmente ou em associação, e apresenta-se "naked" (não conjugado). A presente invenção está igualmente orientada para processos terapêuticos multimodais em que se acrescenta à administração do anticorpo a administração de outras modalidades terapêuticas.

Antecedentes

Os anticorpos contra o antigénio CD20 investigaram-se tendo em vista a terapia de linfomas de células B. Por exemplo, um anticorpo quimérico anti-CD-20, designado por "IDEC-C2B8," apresenta actividade contra linfomas de células B quando administrado sob a forma de anticorpos não conjugados em injeções repetidas de doses que excedem 500 mg por injeção. Maloney et al., Blood 84:2457 (1994); Longo, Curr. Opin. Oncol. 8:353 (1996). Aproximadamente 50 por cento de doentes não Hodgkin, atingidos pela forma passiva insignificante, tratados com esse tratamento manifestaram respostas. As respostas terapêuticas também se obtiveram utilizando um anticorpo monoclonal murino B1 anti-CD-20 marcado com ¹³¹I quando administrado sob a forma de doses repetidas que excedem 600 mg por injeção. Kaminski et al., N. Engl. J. Med. 329:459 (1993); Press et al., N. Engl. J.

Med. 329:1219 (1993); Press et al., Lancet 346:336 (1995). Contudo, em doentes com a forma mais dominante e letal de linfoma de células B, o tipo intermédio ou agressivo, esses anticorpos, quer administrados sob formas não conjugadas quer sob formas radiomarcadas, mostraram apenas actividade moderada.

Doenças auto-imunitárias representam uma categoria de doenças associadas a distúrbios das células B. Exemplos incluem trombocitopénias imuno-mediadas, como púrpura trombocitopénica idiopática aguda e púrpura trombocitopénica idiopática crónica, miastenia *gravis*, nefrite por lúpus, lúpus eritematoso, e artrite reumatóide. Os tratamentos mais comuns são corticosteróides e fármacos citotóxicos, que podem ser muito tóxicos. Esses fármacos suprimem também todo o sistema imunitário, podem originar infecção grave, e provocam efeitos adversos sobre o fígado e rins. Outras terapêuticas que se têm utilizado até ao momento para tratar doenças auto-imunitárias de Classe III têm sido dirigidas contra células T e macrófagos. Permanece a necessidade de processos de tratamento mais eficazes de doenças auto-imunitárias, especialmente doenças auto-imunitárias de Classe III.

A US-A-5 686 072 diz respeito à utilização de uma imunotoxina anti-CD22 com determinadas imunotoxinas anti-CD19 no tratamento de cancro e de doenças auto-imunitárias.

Stein 2 et al., (Cancer Immunol. Immunother. 37:293 (1993)) descrevem a especificidade do anticorpo LL2 pelo epitopo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Portanto, constitui um objectivo da presente invenção proporcionar um processo para o tratamento de doenças auto-imunitárias utilizando um anticorpo contra um antigénio de células B.

Constitui um outro objectivo da presente invenção a utilização comparativa de baixas doses de um anticorpo "naked" (não conjugado) contra um antigénio CD22, ou uma associação de anticorpos "naked" (não conjugados) contra um antigénio CD22 e um outro antigénio de células B, preferivelmente CD20 e/ou CD74.

Ainda um outro objectivo da presente invenção consiste em utilizar uma associação de um ou mais anticorpos "naked" (não conjugados) contra antigénios CD22 e/ou anticorpos contra antigénios de células B que se ligam a fármacos, toxinas ou radioisótopos terapêuticos.

Constitui um outro objectivo da presente invenção proporcionar processos multimodais para o tratamento de doenças auto-imunitárias em que um anticorpo "naked" (não conjugado) contra um antigénio CD22 é suplementado com a administração de outras modalidades terapêuticas, como as direccionadas contra células T, células plasmáticas e macrófagos.

Esses e outros objectivos alcançam-se através da matéria dependente das reivindicações independentes. As formas de realização preferidas podem obter-se a partir das reivindicações dependentes.

Outros objectivos, pontos importantes e vantagens da presente invenção serão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada.

DESCRIÇÃO DETALHADA

1. Resumo

Clones de células B que exibem receptores de auto-anticorpos Ig estão presentes em indivíduos normais. A autoimunidade surge quando essas células B se tornam excessivamente activas, e amadurecem até células plasmáticas que segregam auto-anticorpos. De acordo com a presente invenção, distúrbios auto-imunitários podem tratar-se administrando um anticorpo LL2 "naked" (não conjugado). Em uma forma de realização, utilizam-se doses comparativamente baixas do anticorpo "naked" completo ou de uma associação de anticorpos "naked" completos. Em outras formas de realização, um tal anticorpo LL2 "naked" pode utilizar-se em associação com conjugados de anticorpos que se ligam a um antigénio de células B, tal como são úteis os antigénios CD22, CD20, CD19 e CD74 ou HLA-DR, com fármacos, toxinas ou radioisótopos terapêuticos. A presente invenção está também direccionada para processos terapêuticos multimodais em que à administração do anticorpo se acrescenta a administração de outras modalidades terapêuticas.

2. Definições

Na descrição que se segue utiliza-se amplamente uma série de termos e expressões. Para facilitar a compreensão da presente invenção apresentam-se as seguintes definições.

Um **gene estrutural** é uma sequência de ADN que é transcrita para o ARN mensageiro (ARN_m) que é seguidamente traduzido para uma sequência de aminoácidos característica de um polipéptido específico.

Um **promotor** é uma sequência de ADN que dirige a transcrição de um gene estrutural. Caracteristicamente, um promotor encontra-se localizado na região 5' de um gene, perto do sítio de iniciação da transcrição de um gene estrutural. Se o promotor for um promotor susceptível de indução, então a taxa de transcrição aumenta em resposta a um agente de indução. Em contraste, a taxa de transcrição não é regulada por um agente de indução quando o promotor é um promotor constitutivo.

Uma **molécula isolada de ADN** é um fragmento de ADN que não se encontra integrado no ADN genómico de um organismo. Por exemplo, um gene clonado de um anticorpo é um fragmento de ADN que foi separado do ADN genómico de uma célula de mamífero. Um outro exemplo de uma molécula de ADN isolada é uma molécula de ADN sintetizada quimicamente que não se encontra integrada no ADN genómico de um organismo.

Um **enhancer** (intensificador) é um elemento regulador do ADN que pode aumentar a eficácia da transcrição, independentemente da distância ou orientação do enhancer relativamente ao sítio de iniciação da transcrição.

ADN complementar (ADN_c) é uma molécula de ADN de fita simples que se forma a partir de um molde de ARN_m através da enzima transcriptase reversa. Caracteristicamente, um iniciador (primer) complementar de porções de ARN_m utiliza-se para a iniciação da transcrição reversa. Os peritos na

especialidade utilizam também o termo ADN_c para referir uma molécula de ADN de fita dupla constituída por uma tal molécula de ADN de fita dupla e a sua fita de ADN complementar.

O termo **expressão** refere-se à biossíntese de um produto génico. Por exemplo, no caso de um gene estrutural, a expressão envolve a transcrição de um gene estrutural para o ARN_m e a tradução do ARN_m em um ou mais polipéptidos.

Um **vector de clonagem** é uma molécula de ADN, como um plasmídeo, um cosmídeo, ou um bacteriófago que tem a capacidade de replicar de um modo autónomo em uma célula hospedeira. Os vectores de clonagem contêm caracteristicamente um ou um pequeno número de sítios de reconhecimento em que sequências de ADN estranho se podem inserir de um determinado modo sem a perda de qualquer função biológica essencial do vector, bem como um gene marcador que é apropriado para utilização na identificação e selecção de células transformadas com o vector de clonagem. Os genes marcadores incluem de um modo característico genes que proporcionam resistência à tetraciclina ou resistência à ampicilina.

Um vector de expressão é uma molécula de ADN que compreende um gene que é expresso em uma célula hospedeira. De um modo característico, a expressão génica é colocada sob o controlo de alguns elementos reguladores, incluindo promotores constitutivos ou susceptíveis de indução, elementos reguladores específicos dos tecidos, e enhancers (intensificadores). Esse gene é citado por estar ligado aos elementos reguladores "de um modo funcional".

Um **hospedeiro recombinante** pode ser qualquer célula procariótica ou eucariótica que contém ou um vector de clonagem ou um vector de expressão. Essa expressão inclui também aquelas células procarióticas ou eucarióticas que se têm preparado por técnicas de engenharia genética de modo a conterem os genes clonados no cromossoma ou genoma da célula hospedeira.

Quando utilizado na presente invenção, o termo anticorpo engloba anticorpos "naked" (não conjugados) e anticorpos conjugados e fragmentos de anticorpos, que podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos. Isso inclui ambos os anticorpos policlonais e monoclonais, bem como alguns anticorpos recombinantes, como anticorpos quiméricos e humanizados e proteínas de fusão.

Um **anticorpo quimérico** é uma proteína recombinante que contém os domínios variáveis e regiões determinantes complementares provenientes de um anticorpo de roedor, enquanto o restante da molécula do anticorpo provém de um anticorpo humano.

Anticorpos humanizados são proteínas recombinantes em que as regiões determinantes complementares murinas de um anticorpo monoclonal foi transferido das cadeias variáveis pesadas e leves da imunoglobulina murina em um domínio variável humano.

Anticorpos humanos são anticorpos que ou provêm de humanos e crescem depois em cultura ou se preparam utilizando animais cujos sistemas imunitários foram alterados de forma a responderem a estimulação antigénica mediante a produção de anticorpos humanos.

Quando utilizada na presente invenção, a expressão **agente terapêutico** significa uma molécula ou um átomo, que ocorre conjugado com um radical de um anticorpo para produzir um conjugado que é útil para terapia. Exemplos de agentes terapêuticos incluem fármacos, toxinas, enzimas, hormonas, citocinas, imunomoduladores, compostos de boro e radioisótopos terapêuticos. Radioisótopos terapêuticos preferidos incluem emissores beta, alfa, e Auger, com uma energia em keV (quilo electrão volt) compreendida entre 80 e 500 keV. Radioisótopos terapêuticos exemplares incluem ^{198}Au , ^{32}P , ^{125}I , ^{131}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{67}Cu , e ^{211}At .

Um **anticorpo "naked"** (não conjugado) é um anticorpo completo que não se apresenta conjugado com um agente terapêutico. Anticorpos "naked" (não conjugados) incluem ambos os anticorpos policlonal e monoclonal, bem como alguns anticorpos recombinantes, como anticorpos quiméricos e humanizados.

Um **anticorpo conjugado** é um anticorpo ou um fragmento de um anticorpo que ocorre conjugado com um agente terapêutico.

Um **anticorpo multiespecífico** é um anticorpo que se pode ligar simultaneamente a pelo menos dois alvos que exibem estrutura diferente, por exemplo, dois antigénios diferentes, dois epitopos diferentes no mesmo antigénio, ou um hapteno e/ou um antigénio ou epitopo. A especificidade de um tal anticorpo será para um antigénio ou um epitopo de células B.

Um **anticorpo biespecífico** é um anticorpo que se pode ligar simultaneamente a dois alvos que exibem estrutura diferente. Anticorpos biespecíficos (bsAb) e fragmentos de anticorpos biespecíficos (bsFab) possuem pelo menos um braço

que especificamente se liga a um antigénio ou um epitopo de células B e pelo menos um outro braço que especificamente se liga a um conjugado capaz de ser apontado para um alvo (targetable).

Uma **proteína de fusão** é uma molécula de ligação ao antigénio produzida por tecnologia recombinante em que se ligam dois ou mais anticorpos ou segmentos de fragmentos de anticorpos de cadeia única e diferentes com especificidades iguais ou diferentes. Utilizando técnicas de engenharia molecular podem produzir-se diversas proteínas de fusão biespecíficas. Em uma forma, a proteína de fusão biespecífica é monovalente, constituída por, por exemplo, um gene scFv com um único sítio de ligação para um antigénio e um fragmento Fab com um único sítio de ligação para um segundo antigénio. Em uma outra forma, a proteína de fusão biespecífica é divalente, constituída por, por exemplo, uma IgG com dois sítios de ligação para um antigénio e dois genes scFv com dois sítios de ligação para um segundo antigénio.

3. Produção de Anticorpos Monoclonais, Anticorpos Humanizados, Anticorpos Quiméricos e Anticorpos Humanos

Os peritos experientes na arte conhecem na generalidade os anticorpos anti-CD20, anti-CD22, anti-CD19, e anti-CD74. Ver, por exemplo, Ghetie et al., *Cancer Res.* 48:2610 (1988); Hekman e tal., *Cancer Immunol. Immunother.* 32-364 (1991); Kaminski et al., *N. Engl. J. Med.* 329:459 (1993); Press et al., *N. Engl. J. Med.* 329:1219 (1993); Maloney et al., *Blood* 84:2457 (1994); Press et al., *Lancet* 346:336 (1995); Longo, *Curr. Opin. Oncol.* 8:353 (1995). Mais especialmente, anticorpos monoclonais de roedores contra antigénios CD22, CD20, CD19, ou CD74 podem obter-se por métodos que os peritos

na arte bem conhecem. Ver na generalidade, por exemplo, Kohier e Milstein, *Nature* 256:495 (1975), e Coligan et al., (ed.), *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"]. Resumidamente, os anticorpos monoclonais podem obter-se injectando murganhos com uma composição que inclui o antigénio, confirmando o aparecimento da produção de anticorpos mediante a recolha de uma amostra de soro, a remoção do baço para se obterem linfócitos B, a fusão dos linfócitos B com células de mielomas para se produzirem hibridomas, escolhendo clones positivos que produzem anticorpos contra o antigénio que foi injectado, cultivando os clones que produzem anticorpos contra o antigénio, e isolando os anticorpos das culturas de hibridomas.

A partir de culturas de hibridomas podem isolar-se e purificar-se anticorpos monoclonais utilizando diversas técnicas perfeitamente estabelecidas. Tais técnicas de isolamento incluem cromatografia de afinidade em Proteína-A Sepharose, cromatografia de exclusão por tamanho, e cromatografia de troca iónica. Ver, por exemplo, Coligan nas páginas 2.7.1-2.7.12 e páginas 2.9.1-2.9.3. Ver também, Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", em *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

Para a produção de anticorpos podem obter-se quantidades apropriadas de antigénios bem caracterizados utilizando técnicas padrão. Como exemplo, CD22 podem imunoprecipitar-se a partir de proteína de linfócitos B utilizando os anticorpos depositados descritos por Tedder et al., Patente de invenção norte-americana No. 5 484 892 (1996).

Por outro lado, podem obter-se proteínas de antigénios CD22, CD20, CD19, ou CD74 a partir de células transfectadas cultivadas que superproduzem o antigénio de interesse. Utilizando sequências nucleotídicas publicadas podem construir-se vectores de expressão que compreendem moléculas de ADN que codificam cada uma dessas proteínas. Ver, por exemplo, Wilson et al., J. Exp. Med. 173:137 (1991); Wilson et al., J. Immunol. 150 :5013 (1993). Como esclarecimento, moléculas de ADN que codificam CD22 podem obter-se mediante síntese de moléculas de ADN realizando mutuamente a preparação de longos oligonucleótidos. Ver, por exemplo, Ausubel et al., (ed.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, páginas 8.2.8 a 8.2.13 (1990) ["Ausubel"]. Ver também, Wosnick et al., Gene 60:115 (1987); e Ausubel et al., (ed.) SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, 3ª Edição, páginas 8-8 a 8-9 (John Wiley & Sons, Inc. 1995). Técnicas estabelecidas que utilizam a reacção em cadeia da polimerase proporcionam a capacidade de sintetizar genes tão grandes como 1,8 idiobases em extensão. Adang et al., Plant Molec. Biol. 21:1131 (1993); Bambot et al., PCR Methods and Applications 2-266 (1993); Dillon et al., "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", em METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 15: PCR PROTOCOLS:CURRENT METHODS AND APPLICATIONS, White (ed.), páginas 263-268, (Humana Press, Inc. 1993).

Em uma alteração dessa técnica, os anticorpos monoclonais podem obter-se através da fusão de células de mielomas com células de baço provenientes de murganhos imunizados com uma linha de células pré-B murinas transfectadas de maneira estável com ADN_c que codifica o antigénio de interesse. Ver Tedder et al., Patente de invenção norte-americana No. 5 484 892 (1996).

Um exemplo de um anticorpo monoclonal anti-CD22 murino apropriado é o anticorpo monoclonal LL2 (anteriormente EPB-2), que foi produzido contra células Raji humanas provenientes de um linfoma Burkitt. Pawlak-Byczkowska et al., *Cancer Res.* 49:4568 (1989). Esse anticorpo monoclonal possui uma imunoglobulina de isotipo IgG2 α , e o anticorpo é internalizado com rapidez nas células do linfoma. Shih et al., *Int. J. Cancer* 56:538 (1994). Estudos de imunomarcção por coloração e de radioimunodeteção *in vivo* demonstraram a excelente sensibilidade do LL2 na deteção de linfomas de células B. Pawlak-Byczkowska et al., *Cancer Res.* 49:4568 (1989); Murthy et al., *Eur. J. Nucl. Med.* 19:394 (1992). Além disso, tem-se demonstrado que os fragmentos Fab' de anticorpos monoclonais LL2 marcados com Tc-99m são úteis na identificação (upstaging) imediata de linfomas de células B, enquanto LL2 intactos marcados com I 131 e fragmentos F(ab')₂ de anticorpos monoclonais LL2 marcados têm sido utilizados para marcarem como alvos sítios de linfomas e para induzirem respostas terapêuticas. Murthy et al., *Eur. J. Nuc. Med.* 19:394 (1992); Mills et al., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 34:479 (1993) [Abstract 2857]; Baum et al., *Câncer* 73 (Suppl. 3):896 (1994); Goldenberg et al., *J. Clin. Oncol.* 9:548(1991). Além disso, tem-se demonstrado que fragmentos Fab' de LL2 conjugados com um derivado de exotoxina de *Pseudomonas* induzem remissões totais do crescimento quantificável de xenoenxertos de linfomas humanos em murganhos nus. Kreitman et al., *Cancer Res.* 53:819 (1993). Um exemplo de um anticorpo anti-CD74 é o anticorpo LL1.

Em uma forma de realização adicional, um anticorpo de acordo com a presente invenção é um anticorpo quimérico em que as regiões variáveis de um anticorpo humano foram substituídas pelas regiões variáveis de um anticorpo de LL2

de roedor. As vantagens dos anticorpos quiméricos incluem imunogenicidade reduzida e estabilidade in vivo reforçada.

Os peritos na arte conhecem bem técnicas para a construção de anticorpos quiméricos. Como exemplo, Leung et al., *Hybridoma* 13:469 (1994), descreveram como produziram uma quimera LL2 mediante a associação de sequências de ADN que codificam os domínios V_K e V_H do **anticorpo monoclonal LL2 com os respectivos domínios humanos κ da região constante e IgG₁**. Essa publicação fornece também as sequências nucleotídicas das regiões variáveis das cadeias leve e pesada do LL2, V_K e V_H , respectivamente.

Em ainda uma outra forma de realização, um anticorpo de acordo com a presente invenção é um anticorpo monoclonal "humanizado". Ou seja, regiões determinantes complementares murinas são transferidas das cadeias variáveis pesada e leve de imunoglobulinas murinas para um domínio variável humano, seguindo-se a substituição de alguns restos humanos nas regiões esqueleto (framework region) das suas correspondentes murinas. Os anticorpos monoclonais humanizados de acordo com a presente invenção são apropriados para utilização em processos terapêuticos. Técnicas gerais de clonagem de domínios variáveis de imunoglobulinas murinas estão descritas, por exemplo, na publicação de Orlandi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989). Técnicas de fabrico de anticorpos monoclonais humanizados são descritas, por exemplo, por Jones et al., *Nature* 321:522 (1986). Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988), Verhoeyen et al., *Science* 239:1534 (1988), Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992), Sandhu, *Crit. Ver. Biotech.* 12:437 (1992), e Singer et al., *J. Immun.* 150:2844 (1993). A

publicação de Leung et al., Mol. Immunol. 32:1413 (1995), descreve a construção do anticorpo LL2 humanizado.

Em uma outra forma de realização, um anticorpo de acordo com a presente invenção é um anticorpo monoclonal humano. Tais anticorpos obtêm-se a partir de murganhos transgênicos que se prepararam mediante a aplicação de técnicas de engenharia genética para se produzirem anticorpos específicos humanos em resposta a estimulação antigénica. Nessa técnica, introduzem-se elementos no *locus* das cadeias pesada e leve humanas em estirpes de murganhos derivadas de linhas de células-tronco embrionárias que contêm interrupções que podem ser o alvo para os *loci* da cadeia pesada e da cadeia leve endógenas. Os murganhos transgênicos podem sintetizar anticorpos humanos específicos para antigénios humanos, podendo os murganhos utilizarem-se para produzirem hibridomas secretores de anticorpos humanos. Processos para a obtenção de anticorpos humanos provenientes de murganhos transgênicos são descritos por Green et al., Nature Genet. 7:13 (1994), Lonberg et al., Nature 368:856 (1994), e Taylor et al., Int. Immun. 6:579 (1994).

A presente invenção engloba a associação do anticorpo LL2 com anticorpos e fragmentos de um anticorpo. Os fragmentos de um anticorpo são porções desse anticorpo que se ligam a antigénios, como $F(ab')_2$, $F(ab)_2$, Fab' , Fab , e similares. Os fragmentos de um anticorpo ligam-se ao mesmo antigénio que é reconhecido pelo anticorpo intacto. Por exemplo, um fragmento de um anticorpo monoclonal anti-CD-22 liga-se a um epitopo de CD22. o anticorpo biespecífico bsAb de acordo com a presente invenção inclui, embora sem carácter limitativo, bsmabs IgG x IgG, IgG x $F(ab')_2$, IgG x Fab' , IgG x scFv; $F(ab')_2$ x $F(ab')_2$, Fab' x $F(ab')_2$, Fab' x Fab' , Fab' x

scFv e scFv x scFv. Também, se incluem espécies tais como scFv x IgG X scFv e Fab' x IgG x Fab', scFv x F(ab')₂ x scFv e Fab' x F(ab')₂ x Fab'.

A expressão "fragmento de um anticorpo" inclui também qualquer proteína sintética ou produzida por técnicas de engenharia genética que actue como um anticorpo mediante ligação a um antigénio específico para formar um complexo. Por exemplo, fragmentos de um anticorpo incluem fragmentos isolados, fragmentos de "Fv", constituídos por regiões variáveis das cadeias pesada e leve, moléculas polipeptídicas recombinantes de cadeia simples em que as regiões variáveis das cadeias leve e pesada se ligam através de um ligante (linker) peptídico ("proteínas sFv"), e unidades mínimas de identificação (recognition) constituídas por restos de aminoácidos que mimetizam a região hipervariável.

4. Produção de proteínas de fusão

Outro processo para a produção de anticorpos biespecíficos, bsAbs, consiste em preparar por técnicas de engenharia genética proteínas de fusão recombinantes que ligam dois ou mais anticorpos diferentes de cadeia simples ou segmentos de fragmentos de um anticorpo com as duplas especificidades necessárias. Ver, por exemplo, Coloma et al., Nature Biotech. 15:159-163, 1997. A diversidade de proteínas de fusão biespecíficas podem produzir-se realizando técnicas de engenharia molecular. Em uma forma, a proteína de fusão biespecífica é monovalente, constituída por, por exemplo, um gene scFv com um único sítio de ligação para um antigénio e um fragmento Fab com um único sítio de ligação para um segundo antigénio. Em uma outra forma, a proteína de fusão biespecífica é divalente, constituída por, por exemplo, uma

IgG com dois ou mais sítios de ligação para um antigénio e dois genes scFv com dois sítios de ligação para um segundo antigénio.

Anticorpos biespecíficos funcionais de cadeia simples (bscAb), também designados "diabodies", podem produzir-se em células de mamíferos utilizando processos recombinantes. Ver, por exemplo, Mack et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92:7021-7025, 1995. Por exemplo, bscAb são produzidos mediante junção de dois fragmentos Fv de cadeia simples via um ligante (linker) glicina-serina utilizando processos recombinantes. Os domínios (VH) da cadeia pesada V e (VL) da cadeia leve V de dois anticorpos de interesse isolam-se utilizando processos padrão de PCR. O ADNc dos domínios VL e VH obtido a partir de cada hibridoma liga-se seguidamente para formar um fragmento de cadeia simples no decurso de uma PCR (reacção em cadeia da polimerase) em que se realiza a fusão em duas fases. A primeira etapa da PCR introduz o ligante (linker) (Gly4-Ser1)₃, e a segunda etapa une os amplicons VL e VH. Cada molécula de cadeia simples é seguidamente clonada no seio de um vector de expressão bacteriano. Concluída a amplificação, uma das moléculas da cadeia simples é excisada e subclonada no seio de outro vector, que contém a segunda molécula de cadeia simples de interesse. O fragmento bscAb resultante é subclonado no seio de um vector de expressão eucariótico. A expressão funcional das proteínas pode obter-se mediante transfecção do vector em células ovárias de hamster chinês. Para produzir diversas proteínas de fusão podem utilizar-se processos recombinantes.

5. Acoplamento de Anticorpos em Emulsões Lipídicas

Para os anticorpos de acordo com a presente invenção podem utilizar-se como veículos de fármacos emulsões lipídicas submicrónicas de circulação prolongada, estabilizadas com fosfatidil-etanolamina modificada pelo poli(etilenoglicol) (PEG-PE). As emulsões são formadas por duas partes principais: um núcleo oleoso (oil core), por exemplo, um triglicérido estabilizado por agentes emulsionantes, por exemplo, fosfolípidos. As fracas propriedades emulsionantes dos fosfolípidos podem ser reforçadas mediante a adição de um agente co-emulsionante biocompatível como polissorbato 80. Em uma forma de realização preferida, o anticorpo conjuga-se com a superfície dos glóbulos lipídicos da emulsão por meio do poli(etilenoglicol)-vinilsulfona-N-hidroxi-éster succinimidílico (NHS-PEG-VS), um agente de acoplamento heterobifuncional baseado no poli(etilenoglicol).

A emulsão lipídica submicrónica prepara-se e caracteriza-se como descrito. Lundberg, J. Pharm. Sci., 83:72 (1993); Lundberg et al., Int. J. Pharm., 134:119 (1996). A composição básica da emulsão lipídica é trioleína:DPPC:polissorbato 80, 2:1:0,4 (p/p). Quando indicado, adiciona-se PEG-DPPE ao interior da mistura lipídica em uma quantidade de 2 a 8 mol em % calculada em relação a DPPC [(Dipalmitoylphosphatidylcholine) dipalmitoilfosfatidilcolina].

A técnica de acoplamento tem início com a reacção entre o grupo éster NHS do NHS-PEG-VS e o grupo amino da diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DESPE). Fazem-se reagir 25 μ mol de NHS-PEG-VS com 23 μ mol de DSPE e 50 μ mol de

trietilamina em 1 ml de clorofórmio durante 6 horas à temperatura de 40 °C para produzir um derivado poli(etilenoglicólico) de fosfatidil-etanolamina com um grupo vinilsulfona no terminal distal da cadeia poli(etilenoglicólica) (DSPE-PEG-VS). Tendo em vista a conjugação com o anticorpo, inclui-se DSPE-PEG-VS na emulsão lipídica a 2 mol em % de DPPC. Dispersam-se os componentes nos frascos-ampola das soluções base (stock) à temperatura de -20 °C, evapora-se o solvente até à secura sob pressão reduzida. Adiciona-se soro fisiológico tamponado com um fosfato [PBS (Phosphate buffered saline)], aquece-se a mistura até à temperatura de 50 °C, submete-se a um movimento vorticiforme durante 30 segundos e submete-se à acção de ultra-sons com um sonicador de sonda MSE durante 1 minuto. As emulsões podem armazenar-se à temperatura de 4 °C, e utilizam-se de preferência tendo em vista a conjugação no intervalo de 24 horas.

O acoplamento de anticorpos aos glóbulos da emulsão realiza-se via uma reacção entre o grupo vinilsulfona no terminal PEG distal sobre a superfície dos glóbulos e grupos tiol livres sobre o anticorpo. A vinilsulfona é um derivado interessante tendo em vista o acoplamento selectivo dos grupos tiol. A pH aproximadamente neutro, VS acoplar-se-á, com uma semivida de 15 a 20 minutos, a proteínas contendo grupos tiol. A reactividade da VS é ligeiramente inferior à da maleimida, mas o grupo VS é mais estável em água e produz-se uma ligação estável a partir da reacção com grupos tiol.

Antes da conjugação, o anticorpo é reduzido pela acção de 50 mM de 2-mercaptoetanol durante 10 minutos à temperatura de 4 °C em 0,2 M de tampão Tris (pH 8,7). Separa-se o anticorpo reduzido do 2-mercaptoetanol em excesso com uma

coluna Spin de gele de Sephadex G25, equilibrada com 50 mM de soro fisiológico a 0,9% tamponado com acetato de sódio (pH 5,3). Submete-se o produto a análise relativamente à concentração proteica avaliando a sua absorvância a 280 nm (e assumindo aquela uma solução de anticorpos a 1 mg/ml de 1.4) ou mediante quantificação de anticorpo marcado com ^{125}I . Os grupos tiol verificam-se com Aldrithiol™ seguindo-se a alteração na absorvância a 343 nm e com cisteína como padrão.

A reacção de acoplamento realiza-se em soro fisiológico tamponado com HEPES (pH 7,4) durante a noite à temperatura ambiente sob árgon. Eliminou-se o excesso de grupos vinilsulfona com 2 mM de 2-mercaptoetanol durante 30 minutos, removeram-se os excessos de 2-mercaptoetanol e dos anticorpos por cromatografia em gele utilizando uma coluna CL-48 de Sepharose. Reúnem-se os imunoconjugados próximo do volume em vazio da coluna, esterilizam-se mediante passagem através de um filtro estéril de 0,45 μm , e armazenam-se à temperatura de 4 °C.

Calcula-se a eficácia do acoplamento utilizando anticorpos marcado com ^{125}I . A recuperação das emulsões calcula-se a partir de determinações por [^{14}C]DPPC em experiências paralelas. A conjugação do LL2 reduzido com o grupo VS do DSPE-PEG-VS enxertado à superfície é muito reprodutível com uma eficiência característica próxima de 85%.

6. Utilização Terapêutica de Anticorpos em Modos de Tratamento Simples e Multimodais

A presente invenção considera a utilização do anticorpo LL2 "naked" (não conjugado) como a composição terapêutica

primária para o tratamento de doenças autoimunitárias. Uma tal composição pode conter anticorpos policlonais ou anticorpos monoclonais. Anticorpos LL2 preferidos incluem o anticorpo monoclonal LL2 murino, o anticorpo LL2 quimérico, e o anticorpo LL2 humanizado. Anticorpos contra um único antigénio de células B ou contra mais do que um antigénio de células B podem utilizar-se em associação com anticorpos LL2 "naked" (não conjugados). Em uma forma de realização preferida, utilizam-se anticorpos biespecíficos e proteínas de fusão que compreendem especificidades pelos mais do que um antigénios de células B ou epitopos, em associação com um anticorpo LL2 "naked" ("não conjugado").

Por exemplo, uma composição terapêutica de acordo com a presente invenção pode conter, acrescida de um anticorpo LL2 "naked" (não conjugado), anticorpos anti-CD22 monoclonais "naked" (não conjugados) direccionados contra diferentes epitopos CD22 não bloqueadores. Estudos de inibição cruzada com anticorpos monoclonais identificaram cinco epitopos sobre CD22, designados por epitopos A-E. Ver, por exemplo, Schwartz-Albiez et al., "The Carbohydrate Moiety of the CD22 Antigen Can Be Modulated by Inhibitors of the Glycosylation Pathway", em LEUKOCYTE TYPING IV. WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS, Knapp et al., (ed.), pág. 65 (Oxford University Press 1989). Como esclarecimento, o anticorpo LL2 liga-se ao epitopo B. Stein et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:293 (1993). Consequentemente, a presente invenção considera composições terapêuticas que compreendem uma mistura de anticorpos monoclonais anti-CD22 que se ligam a pelo menos dois epitopos de CD22 e em que a mistura contém o anticorpo LL2 naked. Por exemplo, uma tal mistura pode conter anticorpos monoclonais que se ligam a pelo menos dois

epitopos de CD22 escolhidos no grupo constituído por epitopo A, epitopo B, epitopo C, epitopo D e epitopo E.

Os peritos experientes na arte conhecem bem processos para a determinação da especificidade de ligação por um anticorpo anti-CD22. Processos gerais são apresentados, por exemplo, por Mole, "Epitope Mapping", em METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOLUME 10:IMMUNOCHEMICAL PROTOCOLS, Manson (ed.), páginas 105-116 (The Humana Press, Inc. 1992). Mais especificamente, ensaios de bloqueamento competitivo para determinar a especificidade pelo epitopo CD22 são descritos por Stein et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:293 (1993), e por Tedder et al., Patente de invenção norte-americana No 5 484 892 (1996).

A patente de Tedder descreve também a produção de mutantes CD22, deficientes em um ou mais domínios como imunoglobulinas. Essas proteínas mutantes utilizaram-se para verificar que os domínios 1, 2, 3, e 4 semelhantes a imunoglobulinas correspondem aos epitopos A, D, B, E C, respectivamente. Assim, ligando um anticorpo em ensaio a um painel de proteínas CD22 deficientes em um domínio específico similar a uma imunoglobulina pode identificar-se também a especificidade pelo epitopo CD22.

As composições terapêuticas descritas na presente memória descritiva são úteis para o tratamento de doenças auto-imunitárias, especialmente para o tratamento de doenças auto-imunitárias Classe III incluindo trombocitopénias mediadas pelo sistema imunitário, como trombocitopénia púrpura idiopática aguda e trombocitopénia púrpura idiopática crónica, dermatomiosite, coréia de Sydenham, miastenia gravis, lúpus eritematoso sistémico, nefrite por lúpus, febre

reumática, síndromes poliglandulares, penfigóide bulhoso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, doença de Addison, artrite reumatóide, esclerose múltipla, sarcoidose, colite ulcerativa, eritema multiforme, nefropatia por IgA, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeíte obliterante, síndrome de Sjogren, cirrose biliar primária, tireoidite de Hashimoto, tirotoxicose, escleroderma, hepatite activa crónica, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, pênfigo vulgar, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsal, arterite de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefrite rapidamente progressiva e alveolite fibrosante. Nesse contexto, as composições terapêuticas utilizam-se para retirar do sangue células B normais durante um período prolongado.

Embora um anticorpo LL2 "naked" (não conjugado) constitua a composição terapêutica primária para o tratamento de doenças auto-imunitárias, pode aumentar-se a eficácia dessa terapia com anticorpos "naked" (não conjugados) mediante a adição de outras terapias descritas na presente memória descritiva ao anticorpo LL2 "naked" (não conjugado). Nesses modos de tratamento multimodais, a composição terapêutica suplementar pode administrar-se antes, simultaneamente ou após a administração do anticorpo LL2 "naked" (não conjugado). A terapia multimodal de doenças auto-imunitárias Classe III pode incluir a co-administração de terapêuticas que são direccionadas contra células T, células plasmáticas ou macrófagos, como anticorpos direccionados contra epitopos de células T, mais especialmente contra os epitopos CD4 e CD5. Podem também co-

-administrar-se gamaglobulinas. Em alguns casos, pode ser útil co-administrar fármacos imunossupressores como corticosteróides e possivelmente também fármacos citotóxicos. Nesse caso, podem administrar-se doses mais baixas dos corticosteróides e dos fármacos citotóxicos quando comparadas com as doses administradas em terapias convencionais, reduzindo desse modo os efeitos secundários negativos dessas terapêuticas. As composições terapêuticas suplementares podem administrar-se antes, simultaneamente ou após a administração do anticorpo LL2 "naked" (não conjugado).

Em uma forma de realização alternativa, conjugam-se antigénios CD22, CD20, CD19, e CD74 ou HLA-DR com um fármaco, uma toxina, uma enzima, uma hormona, uma citocina, um imunomodelador um composto derivado do boro ou um radioisótopo terapêutico, ou pode utilizar-se uma proteína de fusão de um anticorpo e uma toxina. Esses conjugados e as proteínas de fusão utilizam-se em associação com o anticorpo LL2 "naked" (não conjugado).

Fármacos que são conhecidos por actuarem sobre células B, células plasmáticas e/ou células T são, de acordo com a presente invenção, especialmente úteis se conjugados com anticorpos de células B, ou administrados como um componente separado em associação com o anticorpo LL2 naked. Esses fármacos incluem metotrexato, butirato de fenilo, briostatina, ciclofosfamida, etoposido, bleomicina, doxorubicina, carmustina, vincristina, procarbazina, dexametazona, leucovorin, prednisona, maitansinóides como DM1, calichearnicina, rapamicina, leflunomida, FK506, imuran, fludarabina, azatiopina, micofenolato, e ciclosporina. Fármacos como imuran, metotrexato, e fludarabina que actuam sobre ambas as células B e as células T são especialmente

preferidas. Exemplos de toxinas que são apropriadamente utilizadas de acordo com a presente invenção podem abranger rícino, abrin, ribonuclease, DNase I, Enterotoxina A estafilocócica, proteína antiviral da erva dos cancos ou erva dos cachos da Índia, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, endotoxina de *Pseudomonas* e RNases, como onconase. Ver, por exemplo, Pastan et al., *Cell* 47:641 (1986), e Goldenberg, *CA - A Cancer Journal for Clinicians* 44:43 (1994). Os peritos na arte conhecem outros fármacos e toxinas apropriado(a)s.

De acordo com a presente podem também utilizar-se em terapias multimodais agonistas e antagonistas de citocinas. O factor de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina-1 (IL-1) são importantes na mediação da inflamação na artrite reumatóide. Consequentemente, reagentes anti-TNF α , como Infiximab e Etanercept (Embre 1), são úteis em terapia multimodal de acordo com a presente invenção, bem como reagentes anti-IL-1.[0062]

Outras terapêuticas secundárias úteis utilizadas em terapias multimodais são IL-2 e GM-CSF, que se podem conjugar com um anticorpo anti-células B, ou associar com um anticorpo anti-células B "naked" (não conjugado) sob a forma de um componente separado.

Em geral, a dose de anticorpos administrados variará dependentemente de factores como a idade, o peso, a altura, o sexo, a situação clínica geral do doente e a história clínica precedente. De um modo especial, pretende-se fornecer ao receptor uma dosagem do constituinte anticorpo, imunoconjugado ou proteína de fusão que se situa entre aproximadamente 1 mg/Kg e 10 mg/Kg (quantidade do agente/peso

corporal do doente), apesar de se poder administrar também uma dosagem mínima ou elevada de acordo com as circunstâncias.

A administração de anticorpos a um doente pode ser endovenosa, intra-arterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intrapleural, intratecal, por perfusão através de um cateter regional, ou por injeção intralesional directa. Quando se administram proteínas terapêuticas mediante injeção, a administração pode ser por perfusão contínua ou sob a forma de bolus mediante injeção única ou múltipla. A injeção endovenosa constitui um modo de administração útil devido à capacidade perfeita da circulação distribuir rapidamente os anticorpos.

Em formas de realização preferidas, administra-se o anticorpo LL2 "naked" (não conjugado), em doses baixas de proteínas, como 20 miligramas a 2 gramas de proteínas por dose, administrada uma vez, ou repetidamente, por via parentérica. Alternativamente, administra-se o anticorpo LL2 "naked" (não conjugado) em doses de 20 a 1000 miligramas de proteínas por dose, ou 20 a 500 miligramas de proteínas por dose, ou 20 a 100 miligramas de proteínas por dose.

Os anticorpos, individualmente ou associados a lipossomas, podem formular-se de acordo com processos conhecidos para preparar composições úteis sob o ponto de vista farmacêutico, nas quais se reúnem as proteínas terapêuticas em uma mistura com um transportador (carrier) aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Uma composição é mencionada como sendo um transportador aceitável sob o ponto de vista farmacêutico se um doente receptor a poder tolerar. Soro fisiológico estéril tamponado com fosfato constitui um

exemplo de um transportador aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. Na arte são do conhecimento geral outros transportadores apropriados. Ver, por exemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19^a ed. (1995).

Com objectivo terapêutico, administram-se anticorpos a um doente em uma quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico. A esse respeito, uma "quantidade eficaz sob o ponto de vista terapêutico" é uma quantidade que é significativa sob o ponto de vista fisiológico. Um agente é significativo sob o ponto de vista fisiológico se a sua presença tem como consequência uma alteração identificável na fisiologia de um doente receptor. No presente contexto, um agente é significativo sob o ponto de vista fisiológico se a sua presença tem como consequência a desactivação ou a morte de células B atingidas como alvo (targeted).

Para controlar a durabilidade da acção de um anticorpo, em uma administração terapêutica, podem utilizar-se processos farmacêuticos adicionais. As preparações de libertação para controlo podem preparar-se mediante a utilização de polímeros para complexar ou adsorver o anticorpo. Por exemplo, polímeros biocompatíveis incluem matrizes de copolímero de etileno e de acetato de vinilo e matrizes de um copolímero de polianidridos de um dímero de ácido esteárico e de ácido sebácico. Sherwood et al., *BiolTechnology* 10:1446 (1992). A taxa de libertação de um anticorpo a partir dessa matriz depende do peso molecular da proteína, da quantidade do anticorpo no seio da matriz, e da dimensão das partículas dispersas. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55:163 (1989); Sherwood et al., *supra*. Em REMINGTON'S PHARMACEUTICAL

SCIENCES, 19^a ed. (1995) estão descritas outras formas de dosagem sólidas.

A presente invenção, descrita na generalidade, será compreendida mais facilmente mediante referência aos exemplos seguintes, que se fornecem como esclarecimento e não se destinam a serem limitativos da mesma invenção.

EXEMPLO 1:

Tratamento de um doente com LL2 humanizado

Submete-se um doente a terapêutica com anticorpo monoclonal LL2 humanizado. Por perfusão administraram-se ao doente por via endovenosa 634 mg de anticorpo LL2 humanizado, e repetiu-se o tratamento 6, 13, e 20 dias após o tratamento inicial. Imediatamente depois da última dose, o valor sérico de hLL2 foi 389,7 µg/ml, e um mês após a última dose o valor sérico de hLL2 foi 186,5 µg/ml. Antes da terapia com hLL2 as células B normais do sangue foram significativamente depletadas no mesmo 2 meses após a terapia, e ocorreu reaparecimento mínimo de células B normais cinco meses após a terapia. Os resultados estão apresentados no quadro seguinte.

Quadro 1: Células B e células T do sangue

Dia	T4/T8	% células B no sangue				% células T no sangue	% HLA-Dr (Ia)
		CD19	CD20	Kappa	lambda		
		Citometria de fluxo					
0	1,5	5	5	6	2	38	6
28		Terapia com hLL2					
34		Terapia com hLL2					
41		Terapia com hLL2					
48		Terapia com hLL2					
		Citometria de fluxo					
76	1,3	<2	<2	<1	<1	71	6
191	2,0	<2	<2	<1	<1	73	4

EXEMPLO 2:

Tratamento de um doente com púrpura trombocitopénica idiopática crónica

Tratou-se um indivíduo com 50 anos do sexo feminino com púrpura trombocitopénica idiopática crónica com prednisona, gamaglobulinas, e doses elevadas de dexametasona, mas a doença evolui. A doente submete-se a esplenectomia, que não consegue estabilizar a doença. A contagem de plaquetas diminui para valores inferiores a 20 000/microlitro, e os episódios hemorrágicos são mais frequentes. Seguidamente trata-se a doente com hLL2, 480 mg cada semana por via endovenosa, durante um período seis semanas. Quatro semanas após a última dose de hLL2, o número de plaquetas aumenta em 100%, e os episódios hemorrágicos tornam-se menos frequentes. Três meses depois da última perfusão de anticorpos a doença está em remissão.

EXEMPLO 3:

Tratamento de um doente com artrite reumatóide progressiva

Um indivíduo com 60 anos do sexo masculino, com artrite reumatóide progressiva grave nas articulações dos dedos, punhos, e cotovelos, falha a terapêutica com metotrexato, e apenas obtém um pequeno alívio quando submetido a terapia com Enbrel. Trata-se seguidamente o doente com hLL2, 600 mg cada semana por via endovenosa, durante um período de oito semanas. Decorridas 3 semanas observa-se uma melhoria de 30% em avaliações de actividade da doença, que se mantém durante 6 meses. Trata-se novamente o doente com hLL2, na mesma dose e frequência. O doente continua a melhorar, e 6 meses após a segunda terapia com hLL2, observa-se uma melhoria de 70%. Não se observam anticorpos anti-hLL2 humanos a qualquer hora durante, ou após a terapia com hLL2. Apesar de as células B normais estarem significativamente reduzidas no sangue, não se observam complicações infecciosas, ou outra toxicidade relacionada com fármacos.

EXEMPLO 4:

Tratamento de um doente com miastenia *gravis*

Um indivíduo com 55 anos do sexo masculino falha a totalidade da terapia convencional para a miastenia *gravis*, e é admitido em uma unidade neurológica de terapêutica intensiva. Estabilizou-se o doente por troca plasmática, e administrou-se imunoglobulina endovenosa para reduzir o título de anticorpos anti-receptor da acetilcolina. O doente permaneceu acamado, e tratou-se seguidamente com hLL2, 800 mg cada semana por via endovenosa, durante um período de seis

semanas. Uma semana após a última dose de hLL2, observa-se uma diminuição de 70% de linfócitos B, e observou-se uma diminuição significativa do título dos anticorpos anti-acetilcolina. Dois meses após a última dose de hLL2 o doente movimentava-se, e recebeu alta hospitalar.

EXEMPLO 5:

Associação terapêutica para artrite reumatóide progressiva

Um outro doente com artrite reumatóide progressiva grave nas articulações dos dedos, punhos, e cotovelos, falha a terapêutica com metotrexato, e apenas obtém um pequeno alívio quando submetido a terapia com Enbrel. Trata-se depois o doente com 300 mg de cada hLL2 e Rituximab, por via endovenosa cada semana, durante um período de cinco semanas. Observam-se melhoras significativas nas avaliações da actividade da doença, o que se mantém durante 6 meses. Trata-se novamente o doente com o mesmo modo de tratamento e continua a melhorar. Seis meses após o segundo procedimento terapêutico, observam-se melhoras adicionais. Não se observaram anticorpos humanos anti-hLL2 ou anti-Rituximab em qualquer momento durante, ou após a terapia. Embora as células B normais estejam significativamente reduzidas no sangue, não se observam complicações infecciosas, ou outra toxicidade relacionada com fármacos.

EXEMPLO 6:

Associação terapêutica para púrpura trombocitopénica idiopática crónica

Trata-se um doente com púrpura trombocitopénica idiopática crónica com prednisona, gamaglobulinas, e doses elevadas de dexametasona, mas a doença evolui. O doente submete-se a esplenectomia, que não consegue estabilizar a doença. A contagem de plaquetas diminui para valores inferiores a 20 000/microlitro, e os episódios hemorrágicos são mais frequentes. Trata-se esse doente com 10 mCi de ítrio-90-hLL2 e 200 mg de hLL2, e seguidamente com doses de 300 mg cada de hLL2 e Rituximab, cada semana por via endovenosa, durante um período de seis semanas. Quatro semanas depois da última dose de hLL2 e de Rituximab, o número de plaquetas aumenta em 150%, e os episódios hemorrágicos tornam-se menos frequentes. Três meses depois da última perfusão de anticorpos a doença está em remissão.

Lisboa, 16 de Outubro de 2009.

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de pelo menos um anticorpo LL2 "naked" (não conjugado) murino, quimérico, totalmente humano ou humanizado, na preparação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio auto-imunitário.
2. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que o anticorpo mencionado é o LL2 humanizado.
3. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, em que o medicamento mencionado se apresenta sob a forma de unidades de dosagem de 20 a 2000 mg por dose, para administração parentérica.
4. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que o medicamento mencionado compreende um grande número das doses parentéricas citadas para administração parentérica repetida.
5. Utilização de acordo com uma qualquer das reivindicações 1. e 3. e 4., em que o mencionado anticorpo é um anticorpo quimérico.
6. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que o medicamento mencionado compreende pelo menos dois anticorpos monoclonais "naked" (não conjugados) orientados contra diferentes epitopos CD22 não bloqueadores.
7. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que a mencionada doença imunitária se escolhe no grupo constituído por púrpura trombocitopénica idiopática aguda, púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiosite, coréia de Sydenham, miastenia *gravis*, lúpus eritematoso sistémico,

nefrite por lúpus, febre reumática, síndromes poliglandulares, penfigóide bulhoso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefrite pós-estreptocócica, eritema nodoso, arterite de Takayasu, doença de Addison, artrite reumatóide, esclerose múltipla, sarcoidose, colite ulcerativa, eritema multiforme, nefropatia por IgA, poliarterite nodosa, espondilite anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeíte obliterante, síndrome de Sjogren, cirrose biliar primária, tireoidite de Hashimoto, tirotoxicose, escleroderma, hepatite activa crónica, polimiosite/dermatomiosite, policondrite, pênfigo *vulgaris*, granulomatose de Wegener, nefropatia membranosa, esclerose lateral amiotrófica, tabes dorsal, arterite de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefrite rapidamente progressiva e alveolite fibrosante.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que se utiliza o mencionado medicamento em associação com um anticorpo anti-CD20 "naked" (não conjugado).

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8., em que o mencionado anti-CD20 "naked" (não conjugado) é um anticorpo anti-CD20 quimérico, humanizado, ou humano.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que se utiliza o medicamento mencionado em associação com um anticorpo anti-CD74 "naked" (não conjugado).

11. Utilização de acordo com a reivindicação 10., em que o mencionado anti-CD74 "naked" (não conjugado) é um anticorpo anti-CD74 quimérico, humanizado, ou humano.

12. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que se administra o medicamento mencionado com uma terapêutica secundária orientada (directed) contra células T, células plasmáticas, macrófagos, ou citocinas inflamatórias, em que se conjuga a mencionada terapêutica secundária com um anticorpo anti-células B ou se administra separadamente.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que se administra o mencionado medicamento com uma terapêutica secundária que consta de um conjugado de um anticorpo anti-células B com IL-2 (interleucina 2) ou GM-CSF (Factor estimulante de colónias de macrófagos e de granulócitos).

14. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que se administra o mencionado medicamento com uma terapêutica secundária orientada contra uma citocina inflamatória.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14., em que a mencionada terapêutica secundária consiste em um agente anti-TNF α ou anti-IL-1.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 1., em que se administra o mencionado medicamento em associação com uma terapêutica secundária que consiste em um conjugado de um anticorpo anti-CD20, anti-CD22 ou anti-CD74 com um fármaco, uma toxina, uma enzima, uma citocina, uma hormona, um composto derivado de boro ou um radionúclido terapêutico.

17. Utilização de acordo com a reivindicação 16., em que o mencionado anticorpo "naked" (não conjugado) e o mencionado anticorpo conjugado são orientados (directed) contra o mesmo antigénio ou epitopo.

18. Utilização de acordo com a reivindicação 16., em que o mencionado anticorpo naked e o mencionado anticorpo conjugado são orientados contra diferentes antígenos ou epitopos.

19. Utilização de acordo com a reivindicação 16., em que o mencionado conjugado é um conjugado que inclui um fármaco em que esse fármaco é o mesmo que actua contra células B, células plasmáticas ou células T ou contra uma citocina inflamatória.

20. Utilização de acordo com a reivindicação 16., em que o mencionado conjugado compreende uma enzima e em que a mencionada enzima é uma RNase.

21. Utilização de acordo com a reivindicação 16., em que o mencionado conjugado é um conjugado que inclui um fármaco escolhendo-se esse fármaco no grupo constituído por metotrexato, butirato de fenilo, briostatin, ciclofosfamida, etoposido, bleomicina, doxorubicina, carmustina, vincristina, procarbazona, dexametazona, leucovorin, prednisona, maitansinóides como DM1, calicheamicina, rapamicina, leflunomida, FK506, imuran, fludarabina, azatiopina, micofenolato, e ciclosporina.

Lisboa, 16 de Outubro de 2009.

RESUMO**"IMUNOTERAPIA DE DOENÇAS AUTO-IMUNITÁRIAS UTILIZANDO
ANTICORPOS QUE TÊM COMO ALVO CÉLULAS B"**

A presente invenção diz respeito a anticorpos que se ligam a antígenos de células B proporcionando um meio eficaz para tratar doenças auto-imunitárias. Os anticorpos e os fragmentos que se podem apresentar conjugados ou "naked" (não conjugados), utilizam-se individualmente ou em terapias multimodais. Os anticorpos podem ser anticorpos biespecíficos que se podem produzir por tecnologia recombinante como proteínas de fusão, ou como híbridos, anticorpos poliespecíficos.