

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96.540

REQUERENTE: CIBA-GEIGY AG., suíça, industrial, com sede em Klybeckstrasse 141, 4002 Basel, Suíça

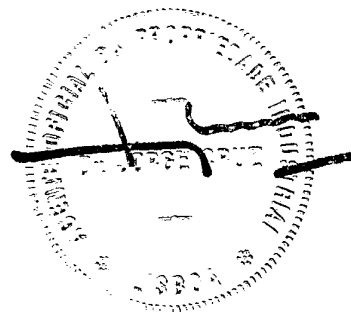
EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA PARA A MATURAÇÃO DE PROTIMÓCITOS CONTENDO FACTOR DE LIGAÇÃO A IgE DE 25K E INTERLEUQUINA-1"

INVENTORES: Patrice Debré e Mohammad Djavad Mossalayi

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Reino Unido, 24 de Janeiro 1990, No.90 01625.4

96.540



CIBA-GEIGY AG

"PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA PREPARAÇÃO FARMACÊUTICA PARA A
MATURAÇÃO DE PROTIMÓCITOS, CONTENDO FACTOR DE LIGAÇÃO 25K IgE E
INTERLEUQUINA-1"

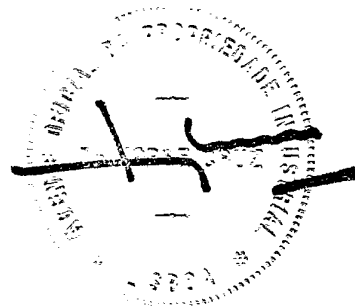
=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a obtenção de uma preparação farmacêutica compreendendo o factor de ligação a IgE de 25K (IgE-bf 25K) e interleuquina-1 (IL-1), que consiste em se processarem os referidos componentes de acordo com processo convencionais.

é também referido o método para a utilização da referida preparação farmacêutica para a estimulação da maturação de protimócitos, por exemplo para o tratamento de imunodeficiências de células T e leucemias de protimócitos.

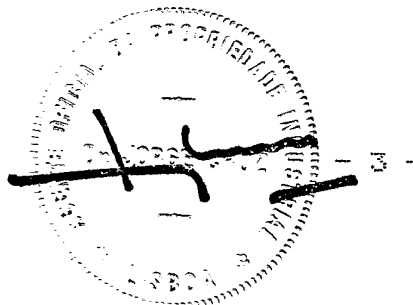


O invento diz respeito a uma preparação farmacêutica compreendendo o factor de ligação a IgE de 25K (IgE-bf 25K) e interleuquina-1 (IL-1) e à utilização da referida preparação farmacêutica para a estimulação da maturação de protimócitos, e.g. para o tratamento de imunodeficiências de células T e leucemias de protimócitos.

Fundamento do invento

Durante o desenvolvimento das células T, as células linfóides mãe migram para o timo rudimentar onde proliferam, rearranjam os seus genes para receptores de antígenos, são seleccionadas tendo em consideração o seu repertório de especificidade MHC e diferenciam-se para células T funcionalmente maduras (Refs. 1-6). Os protimócitos tendo o fenótipo $CD7^+ CD2^- CD3^-$ dos marcadores de superfície celular representam o primeiro passo identificável na diferenciação de células T (Refs. 7-10). Resultados recentes de estudos in vitro (Refs. 8-11) apontam para a capacidade destes protimócitos em adquirirem marcadores de superfície de células T maduras após condicionamento adequado. As interações celulares e mediadas por factores para este processo são mal compreendidas. Foi sugerido um papel para as citocinas tais como IL-1 (Ref. 12) e IL-2 (Ref. 11). A capacidade de IL-1 para funcionar como hemopoietina-1 e para induzir o desenvolvimento de células hemopoiéticas multipotentes caso se combine com os factores estimuladores de colónias, tais como GM-CSF, G-CSF, CSF-1, IL-3, eritropoietina ou actividade potenciadora de eritrócitos, está descrito no pedido PCT WO88/00969.

As células B estão implicadas na produção de várias linfoquinas que podem intervir na diferenciação de células T (Refs. 15, 16). Foi descrita a capacidade dos sobrenadantes derivados de células "B+nulas" induzidas com PHA (linfócitos do



sangue periférico a que foram retiradas células aderentes e células T maduras) para promover a geração in vitro de clones de células T maduras a partir de protimócitos independentemente das suas origens anatómicas (Refs. 8, 13, 14). Esta actividade de diferenciação de protimócitos (PTDA) derivou de células B (Ref. 14). IL-1 sózinha não tem efeito neste aspecto. No entanto, os sobrenadantes derivados de células "B+nulas" com PTDA contêm sempre níveis baixos de IL-1, enquanto nem IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, TNF nem IFN-gama foram detectados nestes sobrenadantes (Refs. 8, 14). As actividades biológicas dos sobrenadantes derivados de células "B+nulas" são e.g. a capacidade para promover a formação de células capazes de gerar colónias T a partir de medula óssea sem células T maduras, tímus e FBL, a capacidade para aumentar respostas derivadas de células CD4⁺, a capacidade para aumentar os números de CFU-GM, CFU-BEMM e BFU-E em culturas Dexter, a capacidade para aumentar a formação de colónias mielóides em culturas de células de medula óssea de doentes com anemia refractária e a capacidade para induzir as marcos de células T maduras em células derivadas de algumas leucemias linfoblásticas agudas com características de protimócitos. Um exemplo de tais leucemias linfoblásticas agudas com características de protimócitos nas quais as células tumorais têm um fenótipo CD7⁺CD4⁻CD8⁻ foi descrito por Kurtzberg et al. (Ref. 10).

Os compostos com PTDA podem ser úteis no tratamento de tais leucemias, pois as células T maduras derivadas das células de leucemia com características de protimócitos poderão ter perdido a tumorigenicidade.

As imunodeficiências de células T podem ser causadas pela incapacidade do organismo para produzir células T maduras ou pela perda de células T maduras. As imunodeficiências de células



T ocorrem e.g. nos doentes com perturbações do funcionamento do timo, nos idosos e nos doentes com SIDA.

Os compostos com PTDA podem ser úteis no tratamento de tais células imunodeficientes.

Objectivo do invento

Constitui um objectivo do presente invento proporcionar uma composição exercendo PTDA. Surpreendentemente, uma preparação compreendendo o factor de ligação a IgE de 25 Kb (IgE-bf 25K), também designado CD23 solúvel (sCD23) e interleuquina-1 (IL-1) tem PTDA.

Outros objectivos do invento são a utilização da referida preparação para estimular a maturação de protimócitos.

Descrição detalhada do invento

O invento diz respeito a uma preparação farmacêutica compreendendo quantidades eficazes do IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com a Identificação de Sequência (SEQ ID) Nº 1 mostrada na Lista de Sequências ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activos e de IL-1 ou de uma sua variante, fragmento ou derivado como uma mistura para usar conjuntamente ou em separado para uso sequenciado. A referida preparação farmacêutica é daqui em diante também referido como preparação farmacêutica de acordo com o invento.

O IgE 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado e IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado são conhecidos ou podem ser preparados de acordo com processos conhecidos. O IgE-bf 25K, suas variantes, fragmentos e derivados e métodos para a sua



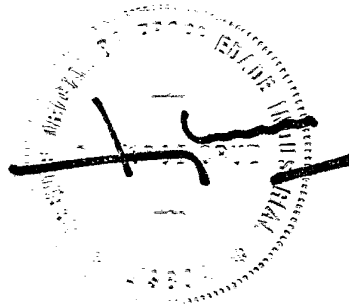
produção estão descritos e.g. em EP-A-0254249e EP-A-0205405. IL-1 e métodos para a produção da mesma estão descritos e.g. em EP-A-0161901 e EP-A-0165654.

Uma variante do IgE-bf 25K é uma proteína com uma sequência de aminoácidos alterada relativamente à sequência à sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO 1. Uma variante inclui variantes naturais, e.g. variantes alélicas humanas ou variantes isoladas a partir de espécies de mamífero não humanos, e.g. derivadas de murganho ou de macaco. Uma variante também inclui uma variante feita artificialmente.

IgE-bf 25K ou uma sua variante é preferencialmente feita por meio de tecnologia de DNA recombinante, e.g. produzida pela expressão numa célula hospedeira heteróloga. Um ou mais aminoácidos podem ser ligados ao extremo N ou C. Ao extremo N pode ser ligado e.g. metionina, N-formil-metionina ou N-acetil-metionina, especialmente quando o produto de expressão é obtido a partir de Escherichia coli. Uma variante feita artificialmente do IgE-bf do invento ou de uma sua variante inclui proteínas caracterizadas pela troca de um ou mais, até cerca de 10, dos aminoácidos do IgE-bf 25K do invento ou de uma sua variante natural por um ou mais de outros aminoácidos.

Dentro do âmbito de um fragmento do IgE-bf 25K do invento estão também fragmentos de variantes do referido IgE-bf 25K.

Um fragmento do IgE-bf 25K ou de uma sua variante é uma cadeia de aminoácidos tendo pelo menos 10 e até 173 aminoácidos sucessivos numa sequência correspondendo ao invento ou à sequência de uma sua variante. Fragmentos diferentes ou idênticos podem ser ligados covalentemente por ligações peptídicas.

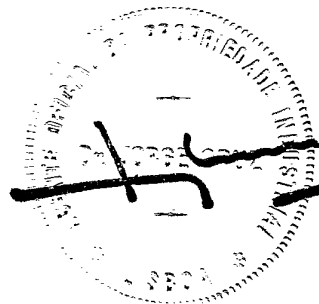


Fragmentos do IgE-bf 25K são em particular os do grupo constituído pelos polipeptídeos começando com qualquer um dos aminoácidos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou 13 e terminando com qualquer um dos aminoácidos 135 a 174 da sequência de aminoácidos com a SEQ ID NO 1. Um fragmento preferido é caracterizado por ele consistir nos aminoácidos 3 a 174. Este fragmento pode ser encontrado para além do IgE-bf 25K do invento nos sobrenadantes de células RPMI9866 e representa assim um fragmento natural.

Os derivados do IgE-bf 25K ou de uma sua variante são aqueles em que os grupos funcionais tais como amina, hidroxilo, mercaptoou carbonilo, são derivatizados, e.g. glicosilados, acilados, amidados ou esterificados, respectivamente. Nos derivados glicosilados um oligossacárido é geralmente ligado a asparagina, serina, treonina e/ou lisina. Os derivados acilados são especialmente acilados por um ácido orgânico ou inorgânico natural, e.g. ácido acético, ácido fosfórico ou ácido sulfúrico. Geralmente o grupo amina N-terminal ou grupos hidroxilo, especialmente de tirosina ou de serina são acilados. Os ésteres são de alcoóis naturais, e.g. metanol ou etanol.

Doutros derivados são sais, especialmente sais farmacêuticamente aceitáveis, por exemplo sais de metais, tais como metais alcalinos e metais alcalinos terrosos, e.g. sais de sódio, potássio, magnésio, cálcio ou zinco, ou sais de amónio formados com amónia ou uma amina orgânica adequada, como seja uma alquilamina inferior, e.g. trietilamina, hidroxil-alquilamina inferior, e.g. 2-hidroxietilamina e similares.

O termo derivado de acordo com o presente invento inclui também derivados de uma variante ou de um fragmento do IgE-bf 25K do invento.



Uma variante farmacologicamente activa, fragmento ou derivado do IgE-bf 25K tem uma influencia estimuladora mensuravel na velocidade de maturação dos protimócitos em combinação com IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo.

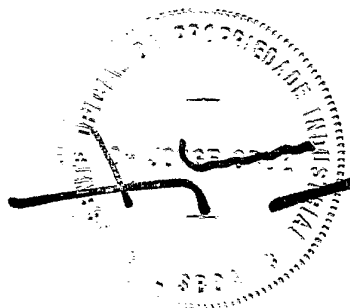
É preferida uma preparação farmacêutica compreendendo a IgE-bf 25K humana tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID NO1.

O termo IL-1 compreende IL-1 purificada a partir do sobrenadante das células de mamífero que naturalmente produzem IL-1, e.g. a partir de monócitos, facultativamente após estimulação da produção de IL-1 em tais células. IL-1 pode derivar de diferentes espécies, e.g. humana, macaco ou murganho, preferencialmente humana. A IL-1 também compreende IL-1 recombinante, e.g. IL-1 α recombinante ou IL-1 β recombinante, produzida em E. coli ou em células de mamífero.

O significado de um derivado de IL-1 está de acordo com o significado de um derivado da IgE-bf 25K do invento aqui referido anteriormente. Incluídos no âmbito do presente invento estão também derivados de variantes ou fragmentos de IL-1.

Uma variante, fragmento ou derivado da IL-1 farmacologicamente activo tem uma influencia estimuladora mensuravel na velocidade de maturação de protimócitos em combinação com o IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo.

Uma preparação farmacêutica de acordo com o invento tem uma influencia estimuladora na velocidade de maturação dos protimócitos. Ela compreende quantidades eficazes do IgE-bf 25K



ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo adequado para estimular a maturação dos protimócitos.

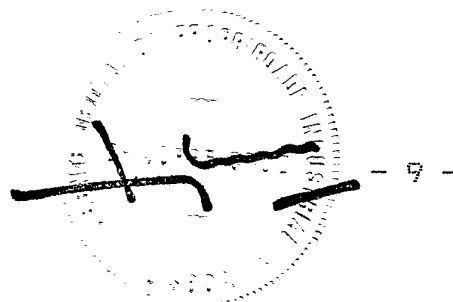
Quantidades eficazes dos ingredientes activos de uma preparação farmacêutica de acordo com o invento compreendem uma proporção de cerca de 50 unidades de Il-1 ou de uma quantidade equivalente de uma variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo até cerca de 0,25 a 125 ng, preferencialmente 25 a 100 ng de um IgE-bf 25K ou de uma quantidade equivalente de uma variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo. Os ingredientes activos podem estar misturados ou separados.

O invento também diz respeito à utilização de uma preparação farmacêutica de acordo com o invento para a estimulação da maturação de protimócitos in vitro, e.g. em culturas celulares ou in vivo, i.e. num organismo.

Um protimócito é uma célula mãe hematopoiética que é capaz de sofrer maturação após estimulação com factores de diferenciação adequados para dar um linfócito T maduro. Um protimócito, pode ser por exemplo, um protimócito de mamífero, e.g. murganho, macaco ou preferencialmente humano.

Um protimócito caracteriza-se, por exemplo, pela presença da marca de superfície celular CD7 e pela ausência de e.g. as marcas de superfície celular CD2, CD3, CD4 e CD8. Assim, um protimócito de acordo com o invento é em particular uma célula $CD7^+CD2^-CD3^-CD4^-CD8^-$.

A maturação dos protimócitos conduz a uma célula T que se caracteriza pela presença de certas marcas de superfície celular que não foram detectadas nos protimócitos. Tais marcas são e.g. CD2, CD3, CD4, CD8 e TCR. Assim, a maturação de um



protimócito conduz à formação de uma célula $CD7^+CD2^+CD3^+TCR^+$ e/ou $CD8^+$.

Os métodos para a determinação das marcas de superfície celular são bem conhecidos, e.g. técnicas de imunofluorescência indirecta.

Um protimócito é também uma célula tendo marcas de superfície celular típicas de protimócitos derivados de um doente com leucemia linfoblástica aguda.

Um protimócito e a maturação de protimócitos para células T pode também ser controlada num nível funcional. A proliferação de uma célula T mas não a de um protimócito pode ser estimulada com uma combinação de anticorpos anti-CD2 ou de anti-CD3 e IL-2. A proliferação de células pode ser determinada com métodos convencionais.

Uma realização preferida do invento é a utilização de uma preparação farmacêutica de acordo com o invento para a estimulação da maturação de células $CD7^+CD2^-CD3^-CD4^-CD8^-$ para células $CD2^+CD3^+TCR^+CD4^+$ e/ou células $CD8^+$ in vitro, e.g. em culturas celulares ou in vivo, i.e. num organismo.

A estimulação da maturação dos protimócitos é por exemplo, realizada pela adição de uma preparação farmacêutica de acordo com o invento a uma cultura celular compreendendo protimócitos numa quantidade tal que seja conseguida uma concentração final de cerca de 0,25 ng/ml até cerca de 125 ng/ml, de preferência entre cerca de 25 ng/ml e cerca de 100 ng/ml do IgE-bf 25K, sua variante, fragmento ou derivado e uma concentração final de cerca de 50 U/ml de IL-1 ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo.

Uma cultura de células compreendendo protimócitos é obtida a partir de tecido compreendendo as referidas células, e.g. a partir de medula óssea, nódulos linfáticos, tecido embrionário, sangue, timo ou amígdalas. O referido tecido pode ser obtido por biópsia e a referida cultura de células pode ser obtida por homogeneização do tecido, isolamento das células linfáticas, e.g. por centrifugação num gradiente de densidade e por cultura das células linfáticas num meio de cultura adequado. Os métodos para o isolamento e cultura de células linfáticas são conhecidos.

Os protimócitos podem ser ainda purificados a partir das referidas células linfáticas seguindo métodos convencionais e.g. por separação das células linfáticas num separador de células ou numa superfície de plástico a que a população de células aderentes se liga. A população de células aderentes pode ser então tratada com uma combinação especificamente citotóxica de anticorpos não dirigidos contra protimócitos mas contra marcas da superfície celular nas outras células da população aderente e com complemento.

A estimulação da maturação de protimócitos pode conduzir ao alargamento de um conjunto de células T e/ou à diminuição de um conjunto de protimócitos numa cultura de células ou num organismo. Após estimulação in vitro de protimócitos isolados a partir de um organismo, as células podem ser novamente injectadas ou implantadas num organismo da mesma espécie ou de uma espécie estreitamente relacionada ou preferencialmente no indivíduo de onde foram isolados os protimócitos.

Assim, o presente invento diz respeito também à utilização de uma preparação farmacêutica do invento para a estimulação da maturação de protimócitos in vitro ou in vivo, por exemplo



para o alargamento de um conjunto de células T in vitro, e.g. em cultura de células, ou in vivo, i.e. num organismo e.g. para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T. Dentro do âmbito de uma imunodeficiência de células T estão incluídas imunodeficiências congénitas e adquirida de células T, e.g. SIDA, imunodeficiências de células T de pacientes idosos, de pacientes que sofreram imuno-supressão terapêutica e de doentes com doenças auto-imunes ou com perturbações de funcionamento do timo. É preferida a utilização no tratamento de SIDA.

O invento diz respeito também à utilização de uma preparação farmacêutica do invento para a estimulação da maturação de protimócitos, por exemplo, para a diminuição de um conjunto de protimócitos in vitro, e.g. em culturas de células, ou in vivo, i.e. num organismo, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma leucemia linfoblástica com características de protimócitos, daqui em diante também referido como leucemia de protimócitos.

Uma leucemia de protimócitos é uma leucemia aguda que se caracteriza por as células tumorais serem protimócitos, e.g. com fenótipo $CD7^+CD4^-CD8^-$.

Uma preparação farmacêutica de acordo com o invento pode ser administrada a um organismo, de preferência um organismo mamífero, mais preferencialmente um humano, parenteralmente, por exemplo, intramuscularmente, subcutaneamente, intravenosamente ou directamente no tecido em que se dá a formação de linfócitos T, e.g. no timo ou na medula óssea, geralmente em formas de dosagem unitárias tais como ampolas. As quantidades dos polipeptídeos a serem administrados depende das suas actividades específicas, da idade, do peso e estado geral do doente, do tipo e gravidade da doença, do modo de administração e tem de se basear na apreciação do médico assistente. Em geral pode ser administrada uma dose

entre cerca de 10 µg e cerca de 5000 µg de cada um dos IgE-fb 25K do invento, ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo e IL-1 ou uma variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo por Kg de peso do corpo e dia.

Numa preparação farmacêutica de acordo com o invento os ingredientes activos estão presentes na forma de uma mistura ou em separado. Se os ingredientes activos estiverem numa preparação farmacêutica separadamente, eles poderão ser administrados por vias separadas.

Uma preparação farmacêutica de acordo com o invento, particularmente se usada no tratamento ou prevenção de imunodeficiências de células T ou de leucemias de protimócitos, compreende veículos farmacêuticamente aceitáveis convencionais que sejam adequados para administração parenteral, e.g. intramuscular, subcutânea ou intraperitoneal e que não interactivam de forma prejudicial com os ingredientes activos.

Existem ampolas adequadas contendo um pó sólido ou ampolas e similares contendo soluções para infusão, de preferência soluções aquosas ou suspensões, sendo possível preparar estas antes de usar, por exemplo a partir de preparações liofilizadas que contêm o ingrediente activo sózinho ou juntamente com um veículo, como seja manitol, lactose, glucose, dextrose, albumina e similares. A preparação farmacêutica pode ser esterilizada e, caso se pretenda misturada com aditivos, por exemplo preservativos, estabilizadores, emulsionantes, solubilizantes, tampões e/ou sais, tais como cloreto de sódio 0,9%, para a regulação da pressão osmótica. A esterilização pode ser conseguida através de filtros de poro pequeno (0,45 µm de diâmetro ou menos) após o que a preparação pode ser liofilizada caso se pretenda. Pode-se adicionar também antibióticos para se assegurar a esterilidade.

Uma preparação farmacêutica de acordo com o presente invento é distribuída em formas de dosagem unitárias, por exemplo ampolas, compreendendo 1 a 2000 mg de um veículo farmacêuticamente aceitável por unidade de dosagem e cerca de 0,001 a 100 mg, de preferência cerca de 0,1 a 50 mg, de cada um dos ingredientes activos por unidade de dosagem.

O invento também diz respeito a um processo para a produção de uma preparação farmacêutica do invento.

O referido processo caracteriza-se por o IgE-bf 25K do invento ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo e IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo serem misturados com um veículo farmacêuticamente aceitável ou, se os ingredientes activos estiverem na forma separada na preparação farmacêutica, são administrados separadamente com um veículo farmacêuticamente aceitável.

Uma composição farmacêutica de acordo com o invento é produzida de acordo com métodos conhecidos per se, por exemplo por processos convencionais de mistura, dissolução, liofilização e similares e contém 0,1% a 100%, especialmente entre cerca de 1% e cerca de 50% das substâncias activas.

O invento diz ainda respeito a uma embalagem contendo uma preparação farmacêutica de acordo com o presente invento facultativamente juntamente com instruções para a sua utilização.

Num organismo ou cultura de células que tenha IL-1 suficiente apenas o IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado ou uma preparação farmacêutica compreendendo o IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo como único ingrediente activo tem de ser administrado para

estimular a maturação de protimócitos. Igualmente, num organismo ou cultura de células tendo suficiente IgE-bf 25K, apenas IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado ou uma preparação farmacêutica compreendendo IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo como único ingrediente activo tem de ser administrado para estimular a maturação de protimócitos.

Como já foi referido atrás, a estimulação da maturação de protimócitos pode levar ao alargamento de um conjunto de células T e/ou à diminuição de um conjunto de protimócitos in vitro, e.g. numa cultura de células ou in vivo, i.e. num organismo.

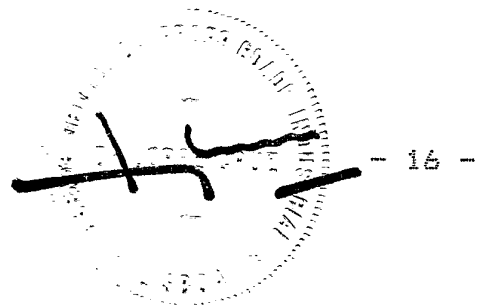
Assim, o presente invento diz respeito também à utilização do IgE-bf ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo, preferencialmente do IgE-bf 25K, para a estimulação da maturação de protimócitos numa cultura de células ou num organismo, e.g. murganho, macaco ou preferencialmente em humanos, tendo suficiente IL-1, por exemplo para o aumento de um conjunto de células T, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, de preferência de SIDA ou para a diminuição de um conjunto de protimócitos, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos.

Igualmente, o invento diz respeito à utilização de IL-1 ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacologicamente aceitável para a estimulação da maturação de protimócitos numa cultura de células ou num organismo, e.g. murganho, macaco ou preferencialmente em humanos, compreendendo IgE-bf 25K suficiente, por exemplo para o alargamento de um conjunto de células T, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, preferencialmente de SIDA ou para a diminuição de um

conjunto de protimócitos, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos. O significado de IL-1 e das suas formas preferidas é o mesmo dado atrás.

Um outro objectivo do presente invento é a utilização do IgE-bf 25K ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacológicamente activo para a obtenção de uma preparação farmacêutica para a estimulação da maturação de protimócitos in vitro, e.g. numa cultura de células ou in vivo, i.e. num organismo, e.g. em murganho, macaco ou de preferência em humanos, por exemplo para o alargamento de um conjunto de células T, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, tais como as referidas atrás, preferencialmente de SIDA, ou para a diminuição de um conjunto de protimócitos, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos. A preparação farmacêutica contém apenas IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacológicamente activo ou facultativamente também IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado farmacológicamente activo como ingrediente activo. O primeiro tipo de preparação farmacêutica é para usar numa cultura de células ou organismo tendo IL-1 suficiente.

Um objectivo do invento é também a utilização de IL-1 ou de uma sua variante, fragmento ou derivado farmacológicamente activo para a obtenção de uma preparação farmacêutica para a estimulação da maturação de protimócitos in vitro, e.g. numa cultura de células ou in vivo, i.e. num organismo, e.g. em murganho, macaco ou preferencialmente em humano, por exemplo para o alargamento de um conjunto de células T, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, preferencialmente de SIDA ou para a diminuição de conjunto de protimócitos, e.g. para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos. A preparação farmacêutica contém apenas IL-1 ou uma sua



variante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo ou facultativamente tambem o IgE-bf 25K ou uma sua varinante, fragmento ou derivado farmacologicamente activo como ingrediente activo. O primeiro tipo de preparacao farmaceutica e para usar numa cultura de celulas ou organismo tendo suficiente IgE-bf 25K.

Abreviaturas

As abreviaturas aqui usadas atrás e nos exemplos têm os seguintes significados:

| | |
|---------------|--|
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| ALL | Leucemia Linfoblástica Aguda |
| BFU-E | Unidade Formadora de Eclosões-Eritrócitos |
| CFU-GEMM | Unidade Formadora de Colónias-Granulócitos, Eritrócitos, Monócitos, Megacariócitos |
| CFU-GM | Unidade Formadora de Colónias-Granulomonócitos |
| IL-1 | Interleuquina-1 |
| rIL-1 | Interleuquina-1 recombinante |
| IL-2 | Interleuquina-2 |
| rIL-2 | Interleuquina-2 recombinante |
| Mab-45-afigel | Gel de afinidade revestido com Anticorpo Monoclonal 45 |
| MHC | Complexo major de histocompatibilidade |
| FBL | Linfócito do sangue periférico |
| PHA | Fito-hemaglutinina |
| PTDA | Actividade de diferenciação de protimócitos |
| TcR | Receptor de células T |

Parte experimental

Os exemplos que se seguem servem para ilustrar o presente invento, ainda, eles não devem ser encarados como uma sua limitação.

Anticorpos monoclonais (mAbs)

| mAb | Antigênio | Fonte, Referência |
|---------------|-------------------------------|--|
| OKT6 | CD1 | Ortho Pharmaceuticals |
| OKT11A | CD2 | Ortho Pharmaceuticals |
| OKT3 | CD3 | Ortho Pharmaceuticals |
| OKT4 | CD4 | Ortho Pharmaceuticals |
| OKT8 | CD8 | Ortho Pharmaceuticals |
| WT31 | CD3/complexoTCR $\alpha\beta$ | Becton Dickinson, Grenoble, France |
| RFT2 | CD7 | Ref. 20 |
| IOM2 | CD14 | Immunotech |
| IOB4 | CD19 | Immunotech, Marseille, Limigny, France |
| IOB6 | CD23, Ige-bf 25K | Immunotech, Marseille, Lumigny, France |
| IOT14 | CD25 | Immunotech, Marseille, Lumigny, France |
| anti-Tigama A | TCR γ | Ref. 21 |
| STCS-1 | TCR δ | T cell Sciences, Cambridge, MA |

Cultura de linfócitos

Todos os linfócitos foram cultivados de rotina numa densidade de cerca de 10^6 células/ml em meio McCoy's 5A (Flow



Laboratories) modificado como descrito em Robinson et al. (Ref. 18). Todos os meios foram suplementados com soro humano (HS) AB, plasma humano (HP) AB ou soro fetal de vitela (FCS). O soro AB e o plasma AB foram obtidos de doadores com o grupo sanguíneo AB⁺. As culturas foram incubadas a 37°C numa atmosfera saturada com água contendo 6% CO₂.

Exemplo 1: Estimulação da maturação de células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ purificadas

Os tímócitos foram obtidos de modo conhecido por se cardando fragmentos tímicos (Ref. 17). Células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ foram isoladas a partir de tímócitos por aderência a superfícies de plástico seguido de dois ciclos de tratamento citotóxico como descrito por Mossalayi et al. (Ref. 8) com OKT11A, OKT3, OKT4 e OKT8 (Ortho Pharmaceuticals, Raritan, NJ) e subsequente incubação com complemento. O complemento usado neste trabalho é um soro de coelhos com 4 semanas de idade obtido por punção intracardiaca directa. O complemento foi testado quanto à ausência de toxicidade inespecífica em precursores de células T humanas. As células CD7⁺ foram então sujeitas a selecção positiva por aplicação das células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ em frascos revestidos com o anticorpo monoclonal RFT2A (IgM, anti-CD7) como descrito (Ref. 13).

As células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ foram colhidas e centrifugadas a 1250 g durante 25 min num gradiente de Ficoll para eliminar as células mortas. As células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ recuperadas do gradiente de Ficoll eram cerca de 0,37% dos tímócitos totais.

A maturação das células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ foi estimulada pela sua incubação durante 48 horas a 37°C numa atmosfera húmida saturada contendo 6% CO₂ numa densidade de 10⁶

células/ml em meio MacCoy's 5A contendo 20% de soro AB descomplementado e filtrado obtido de humanos saudáveis e uma ou mais combinações dos seguintes factores:

IgE-bf recombinante tendo a sequência de aminoácidos com a SEQ ID N2 1 numa concentração de 25 ng/ml.

rIL-1 β (50 U/ml; Glaxo, Geneva).

rIL-2 (100 U/ml; Glaxo, Geneva).

IOB6 (25 μ g/ml; anticorpo monoclonal, IgG1K).

IOT14 (10 μ g/ml; anticorpo monoclonal, IgG2a).

As células foram então colhidas a 450 g e o estado de maturação das células foi testado por análise das marcas de superfície das células pela técnica de imunofluorescência indirecta descrito na Ref.(8). As células colhidas antes da incubação com os factores assim como as células incubadas em meio nutritivo sem factores foram usadas como testemunha. As células foram marcadas com os seguintes anticorpos monoclonais (antígeno reconhecido entre parêntesis): OKT6 (CD1), OKT11A (CD2), OKT3 (CD3), OKT4 (CD4), OKT8(CD8), WT31 (reconhecendo o complexo CD3/TCR $\alpha\beta$), IOT14 (CD25), IOB4 (CD19), RFT2A (CD7), anti-TigamaA ou ϵ TCS-1 (TcR δ). Conjugado de fluoresceína anti-fragmentos F(ab') de murganho (Beckton Dickinson) foi aplicado como segundo anticorpo (todos os anticorpos e fragmentos são usados numa diluição final de 1/50). Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela I: Fenótipo de superfície de timócitos CD7⁺ purificados antes e após 48 h de incubação com diferentes factores

| Marca de superfície | % de células positivas na fluorescência | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----|-----|------|-----|-------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| | CD1 | CD2 | CD3 | WT31 | CD4 | CD4,8 | CD7 | CD8 | CD14 | CD19 | CD25 | TCRαβ | TCRγδ |
| Antes da incubação | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 92 | 1 | 3 | 1 | 4 | 2 | 0 |
| Após incubação com: | | | | | | | | | | | | | |
| nada | 3 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 93 | 3 | 1 | 1 | 5 | 2 | 1 |
| rIL-1β | 2 | 4 | 4 | 3 | 1 | 2 | 92 | 1 | 1 | 1 | 8 | ND | ND |
| rIL-2 | 2 | 4 | 3 | 2 | 2 | 0 | 90 | 0 | 0 | 1 | 10 | ND | ND |
| IgE-bf 25K recombinante | 1 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 86 | 2 | 2 | 1 | 4 | ND | ND |
| rIL-1B + rIL-2 | 2 | 5 | 3 | 2 | 2 | 2 | 89 | 2 | 1 | 2 | 9 | ND | ND |
| IgE-bf+25K recombinante rIL-2 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 | 1 | 93 | 2 | 3 | 1 | 11 | ND | ND |
| IgE-bf +25K recombinante rIL-1B | 6 | 53 | 45 | 39 | 23 | 7 | 95 | 37 | 2 | 0 | 34 | 4 | 3 |
| IgE-bf +25K recombinante rIL-1B + rIL-2 | 7 | 59 | 51 | 39 | 21 | 8 | 97 | 33 | 1 | 1 | 33 | ND | ND |
| IgE-bf +25K recombinante rIL-1β + IOB6 | 4 | 7 | 5 | 2 | 3 | 3 | 83 | 4 | 2 | 2 | 7 | ND | ND |

ND: não realizado

Handwritten signature and stamp.

Exemplo 2: Estimulação mitogénica das células derivadas das células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ estimuladas no sentido da maturação

Células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻ foram incubadas durante 24h na presença de vários factores como descrito no Exemplo 1. Elas foram então lavadas em Solução Equilibrada de Sais de Hank (HBSS, Institut Pasteur, Paris, França) e subsequentemente cultivadas em meio de McCoy 5A (10⁶ células/ml, 37°C, 6% CO₂) na presença de ascites diluídas a 1:400 contendo mAb anti-CD2_{I+III} (Ref. 22). No dia 5, adicionou-se 1 mCi ³H-Timidina a 5 x 10⁴ células num volume final de 0,1 ml durante 24 horas. As células foram lavadas em HBSS, filtradas através de papel Skatron (MQ 11731; Suffolk, UK), dissolvidas em solução de cintilação (Pico-Fluor, Packard, Groningen, Netherlands) e contagens radioactivas foram determinadas usando um Contador de Cintilação B (Beckman). Os resultados médios e desvios padrões de quatro séries independentes de experiências estão apresentados na Tabela 2. Não foi obtida uma resposta significativa de proliferação celular se as soluções de IgE-bf 25K forem pré-incubadas com esferas de sefarose revestidas com IOB6 (resultados não apresentados).

Tabela 2: Resposta proliferativa (incorporação de ^3H -timidina) de células $\text{CD7}^+\text{CD2}^-\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ após condicionamento in vitro

| Células pré-incubadas com: | CPM ($\times 10^3$)/ 5×10^4 células |
|---|--|
| Não | 2,6 + 1,1% |
| IgE-bf 25K recombinante | 2,4 + 1,2 |
| rIL-1 β | 2,8 + 1,4 |
| IgE-bf 25K recombinante + rIL-1 β | 12,9 + 3,3 |
| rIL-2 | 3,1 + 1,5 |
| rIL-1 β + rIL-2 | 3,7 + 1,8 |
| IgE-bf 25K recombinante + rIL-1 β + rIL-2 | 16,2 + 4,0 |
| IgE-bf 25K recombinante + rIL-2 | 3,2 + 0,6 |

* Média + desvio padrão de 4 experiências, cada uma feita em triplicado

Exemplo 3: Estimulação mitogênica dependente da dose e maturação de células $\text{CD7}^+\text{CD2}^-\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-$

Células $\text{CD7}^+\text{CD2}^-\text{CD3}^-\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ foram cultivadas durante 48 horas em meio de McCoy 5A (10^6 células/ml, 37°C , 6% CO_2) na presença de uma concentração constante de rIL1 β (50 U/ml) e de várias concentrações de IgE-bf 25K recombinante. As células foram então colhidas e lavadas. A percentagem de protimócitos CD7^+ que adquiriram a expressão de CD2 e de CD3 foi então determinada por técnicas de imunofluorescência indirecta com OKT11 (anti-CD2) e OKT3 (anti-CD3) e com soro de coelho anti-F(ab') $_2$ de murganho como segundo anticorpo (todos os anticorpos e fragmentos foram usados numa diluição final de 1:50). Numa experiência paralela a resposta proliferativa das células foi determinada de acordo com o Exemplo 2. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Resposta proliferativa (incorporação de H^3 -timidina) e expressão das marcas de superfície celular CD2 e CD3 em células $CD7^+CD2^-CD3^-CD4^-CD8^-$ após incubação na presença de várias concentrações de IgE-bf 25K recombinante

| IgE-bf 25K recombinante | Células $CD2^+CD3^+$ (%)* | Respostas de crescimento (cpm $\times 10^3$)** |
|-------------------------|------------------------------|--|
| 0 | 7 | 1,2 |
| 0,05 | 7 | 1,3 |
| 0,25 | 17 | 1,8 |
| 2,5 | 30 | 2,6 |
| 25 | 65 | 6,8 |
| 50 | 63 | 6,6 |
| 75 | 59 | 6,2 |
| 100 | 55 | ND |
| 125 | 21 | 2,8 |
| 250 | 6 | 0,8 |

* Média de 2 experiências, desvio padrão <10 %

** Média de 2 experiências, desvio padrão <25%

ND = Não efectuado.

Exemplo 4: Efeito sinérgico de IgE-bf 25K e rIL-1R na capacidade de clonagem de células derivadas da maturação induzida de células $CD7^+CD2^-CD3^-CD4^-CD8^-$

Células $CD7^+CD2^-CD3^-CD4^-CD8^-$ foram incubadas em meio de McCoy 5A (10^6 células/ml, 37°C, 6% CO_2) durante 48 horas na presença de 25 ng/ml de IgE-bf 25K, 25µg/ml IOB4, 50 U/ml de rIL-1β e/ou 1000 U/ml de rIL-2. IOB4 foi usado numa concentração

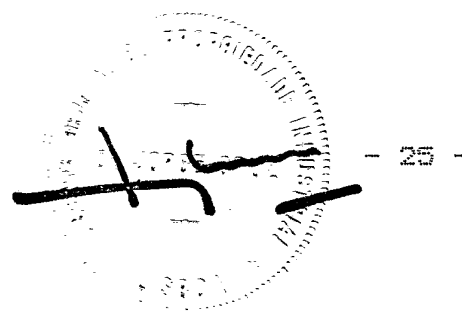
de 25 µg/ml como testemunha do mesmo isotipo par IOB6 e não influência inibidora no efeito de IgE-bf 25K.

As células foram então lavadas em HBSS e cultivadas em diluições limites como descrito por Mossalayi et al., (Ref. 8) na presença de anti-CD2_{I+III} (ascistes 1:400, Ref. 22) e 50 U/ml de rIL-2. 10⁴ células CD2 autólogas irradiadas (2500 rads) foram também adicionadas à cultura. As frequências de clonagem foram avaliadas como descrito por Porter e Berry (Ref. 23) por contagem das células positivas versus negativas no dia 10 após cultura. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Efeito sinregístico de IgE-bf 25K recombinante e rIL-1β na capacidade de clonagem de células derivadas da maturação induzida em células CD7⁺CD2⁻CD3⁻CD4⁻CD8⁻

| CÉLULAS PRÉ-TRATADAS COM | FREQUÊNCIA DE CLONAGEM | |
|--|------------------------|---------------|
| | MÉDIA | GAMA* |
| Nada | 1/184 | 1/95 - 1/264 |
| rIL-1β | 1/123 | 1/69 - 1/168 |
| IgE-bf 25K recombinante | 1/145 | 1/119 - 1/209 |
| IgE-bf 25K recombinante + rIL-1β | 1/2,6 | 1/1,8 - 1/3,6 |
| IgE-bf 25K recombinante + rIL-1β + rIL-2 | 1/2,1 | 1/1,6 - 1/3,2 |
| IgE-bf 25K recombinante + rIL-1β + rIL-2 + IOB6 | 1/98 | 1/65 - 1/112 |

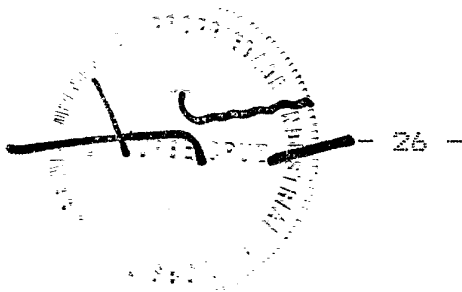
* Média e gama das frequências de clonagem (cavidades positivas/cavidades negativas) de quatro dadores distintos.



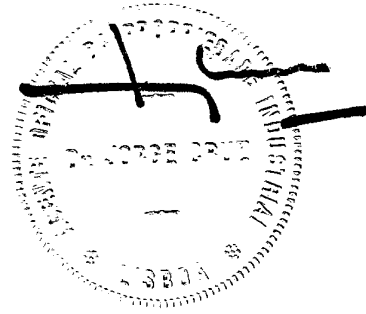
Referências

1. Snodgrass, H.R., Kisielow, P., Kiefler, M., Steinmetz, M. & von Boehmer, H. Nature 313, 592-595 (1985).
2. Raulet, D.H., Garman, R.D., Saito, H. & Tonegawa, S. Nature 314, 103-107 (1985).
3. Born, W., Yague, J., Palmer, E., Kappler, J. & Marrack, P. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82, 2925-2929 (1985).

4. Ceredig, R., Dialynas, D.P., Fitch, F.W. & MacDonald, H.R. J. Exp. Med. 158, 1654-1671 (1983).
5. Marrack, P. et al. Cell 53, 627-634 (1988).
6. Sia Teh, H. et al. Nature 335, 229-233 (1988).
7. Furley et al. Cell 46, 75-87 (1986).
8. Mossalayi, M.D. et al. Blood, 71, 1281-1287 (1988).
9. Haynes, B.F., Martin, M.E., Key, H. & Kurtzberg, J.J. Exp. Med. 168, 1061-1080 (1988).
10. Kurtzberg, J. et al. Blood 73, 381-390 (1989).
11. Toribio, M.L. et al. J. Exp. Med. 168, 2231-2249 (1988).
12. Rock, K.L. & Benacerraf, B.J. Immunol. 132, 1654-1662 (1984).



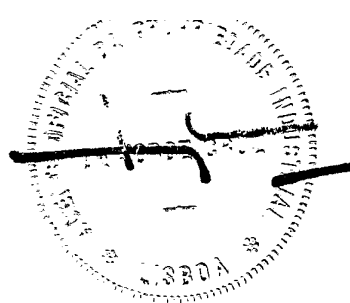
13. Mossalayi, M.D. et al. J. Immunol. 134, 2400-2404 (1985).
14. Lecron, J.C. et al. Exp. Hematol. 17, 785-790 (1989).
15. Jurgenson, C.H., Ambrus, J.L. & Fauci, A.S. J. Immunol. 136, 4542-4547 (1986).
16. Taira, S., Matsui, M., Hayakama, K., Yokoyama, T. & Nariuchi, H.J. Immunol. 139, 2957-2964 (1987).
17. Dallol, A.H. et al., Exp. Hematol. 17, 774-778 (1989)
18. Robinson, W.A. (1971) In vitro cell culture of hemopoietic cells. In: Dicke, K.A., and Beckum, V. (eds.). Rijkwijk.
19. Mossalayi et al., Tissue Antigen 33, 100 (1989)
20. Campana, D. et al., J. Immunol. 142, 57-66 (1989)
- 21 Faure, F. et al., J. Immunol. 141, 3357-60 (1988).
22. Huet, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 84, 7222-26 (1987).
23. Porter, E.H. and Berry, R.J. Br. J. Cancer 17, 583-89 (1963).



REIVINDICAÇÕES:

12. - Processo para a obtenção de uma preparação farmacêutica, especialmente para aplicação parentérica ou intravenosa, compreendendo uma quantidade eficaz de IgE-bf 25K, tendo a sequência de aminoácidos com a SEQ ID No.1:

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



ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, e de IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, sob a forma de uma mistura para usar conjuntamente ou na forma separada para usar sequenciadamente, caracterizado por os componentes serem processados de acordo com métodos convencionais e por se utilizar no referido processo uma proporção de aproximadamente 50 unidades de IL-1 ou uma quantidade equivalente de uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, para cerca de 0,25 a 125 ng de IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com a SEQ ID No.1 ou uma quantidade equivalente de uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser usado o IgE-bf 25K humano tendo a sequência de aminoácidos SEQ ID No.1.

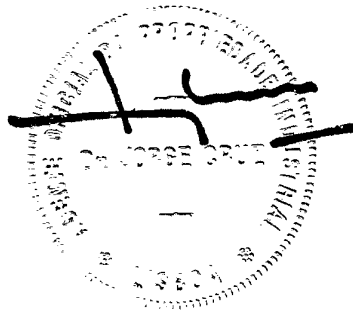
3a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser usada IL-1.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por ser usada IL-1 recombinante.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por ser usada IL-1 β recombinante.

6a. - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por ser usada IL-1 humana.

7a. - Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por usada IL-1 β humana recombinante.

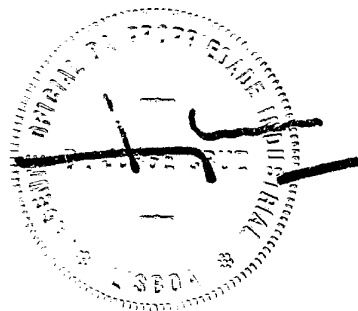


8a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser usada uma proporção de aproximadamente 50 unidades de IL-1 ou uma quantidade equivalente de uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activo, até aproximadamente 25 a 100 ng de IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID No.1 ou uma quantidade equivalente de uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activas.

9a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a preparação farmacêutica estar na forma de dosagem unitária.

10a. - Método para a utilização de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, para a estimulação da maturação de protimócitos, in vitro ou in vivo, nomeadamente para a estimulação da maturação de protimócitos de mamíferos, especialmente protimócitos humanos, em particular para a estimulação da maturação de células $CD7^+CD2^-CD3^-CD4^-CD8^-$ para células $CD2^+CD3^+TCR^+CD4^+$ e/ou $CD8^+$, caracterizado por o IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID NO 1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 0,25 ng/ml a cerca de 125 ng/ml, e a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicada numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

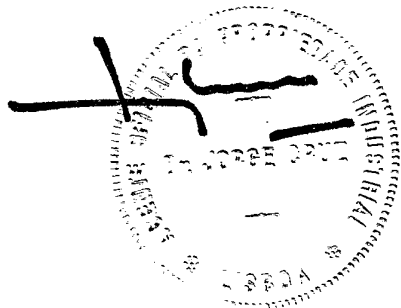
11a. - Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por o IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 25 ng/ml a cerca de 100 ng/ml, e a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.



12a. - Método para a utilização de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, para a estimulação da maturação de protimócitos, in vitro ou in vivo, nomeadamente para o aumento de um conjunto de células T, especialmente para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, em particular de uma imunodeficiência adquirida de células T, principalmente para o tratamento ou prevenção de AIDS, caracterizado por o IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID Nº 1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 0,25 ng/ml a cerca de 125 ng/ml, e a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicada numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

13a. - Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por o IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 25 ng/ml a cerca de 100 ng/ml, e a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

14a. - Método para a utilização de uma preparação farmacêutica de acordo com a reivindicação 1, para a estimulação da maturação de protimócitos, in vitro ou in vivo nomeadamente para a diminuição de um conjunto de protimócitos, especialmente para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos, em particular uma leucemia de protimócitos em que as células de tumor têm um fenótipo $CD7^+CD4^-CD8^-$, caracterizado por o IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID Nº 1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 0,25 ng/ml a cerca de 125 ng/ml, e a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou

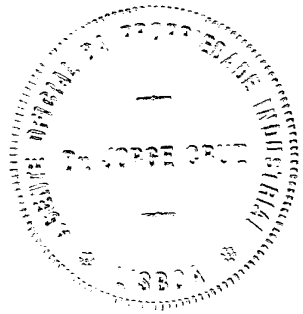


derivado, biologicamente activos, ser aplicada numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

15a. - Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado por o IgE-bf 25K ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 25 ng/ml a cerca de 100 ng/ml, e a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

16a. - Método para a utilização do IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com a SEQ ID No.1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, para a estimulação da maturação de protimócitos numa cultura celular ou num organismo compreendendo IL-1 suficiente, nomeadamente para o aumento de um conjunto de células T, especialmente para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, caracterizado por o IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID No 1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 0,25 ng/ml a cerca de 125 ng/ml.

17a. - Método para a utilização do IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com a SEQ ID No.1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, para a estimulação da maturação de protimócitos numa cultura celular ou num organismo compreendendo IL-1 suficiente, nomeadamente para a diminuição de um conjunto de protimócitos, especialmente para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos, caracterizado por o IgE-bf 25K tendo a sequência de aminoácidos com SEQ ID No 1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, ser aplicado numa concentração final de aproximadamente 0,25 ng/ml a cerca de 125 ng/ml.

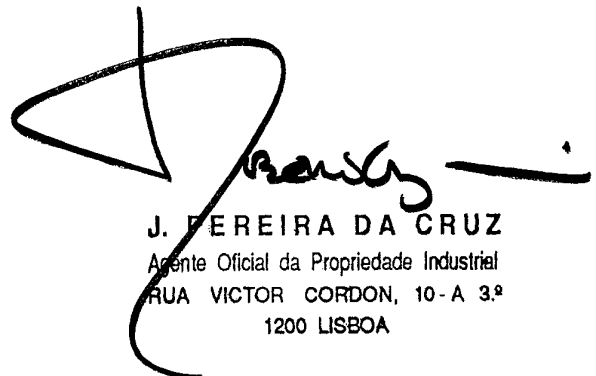


18a. - Método para a utilização da IL-1 ou de uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, na estimulação da maturação de protimócitos numa cultura celular ou num organismo compreendendo IgE-bf 25K suficiente, nomeadamente para o aumento de um conjunto de células T, especialmente para o tratamento ou prevenção de uma imunodeficiência de células T, caracterizado por a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicada numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

19a. - Método para a utilização da IL-1 ou de uma sua variante, fragmento ou derivado, farmacologicamente activos, na estimulação da maturação de protimócitos numa cultura celular ou num organismo compreendendo IgE-bf 25K suficiente para a diminuição de um conjunto de protimócitos, especialmente para o tratamento ou prevenção de uma leucemia de protimócitos, caracterizado por a IL-1 ou uma sua variante, fragmento ou derivado, biologicamente activos, ser aplicada numa concentração final de aproximadamente 50 U/ml.

Lisboa, 22 de Janeiro de 1991

O ADJUNTO



J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A 3.º
1200 LISBOA