

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97.034

REQUERENTE: SANDOZ S.A., e ROYAL FREE HOSPITAL SCHOLL OF MEDICINE, suíça, industrial, em CH-4002 Basel Suíça e Instituição Educacional, britânica, em Rowland Hill Street, London NW3 2PF - Inglaterra

EPÍGRAFE: "PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE MOLECULAS DE LIGAÇÃO AO ANTIGENIO CD25"

INVENTORES: PETER LLOYD AMLOT; ARNE NALPON AKBAR; GUNTHER HEINRICH; SALVATORE CAMMISULI

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

REINO UNIDO, em 16 Março 1990 e em 5 de Setembro de 1990 sob os Nos.9005962 e 9019323.

97.034

SANDOZ S.A.

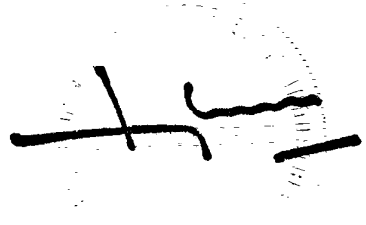
"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO AO ANTIGÊNIO CD25"

=====

MEMÓRIA DESCRITIVA

Resumo

O presente invento diz respeito a um processo para a produção de novos anticorpos monoclonais contra o antigénio CD25, os quais são caracterizados pela sequência de aminoácidos das suas regiões hipervariáveis. Inicialmente produzidos na forma murina, eles podem ser convertidos em formas quiméricas ou humanizadas, imunoconjugados ou fragmentos de anticorpos (descritas de uma forma geral como moléculas de ligação). Os produtos são úteis para a profilaxia ou tratamento da rejeição de transplantes, particularmente em combinação com outros anticorpos contra células T activadas, por exemplo anticorpos CD7.



Este invento está relacionado com imuno-supressão e mais particularmente proporciona anticorpos monoclonais e outras moléculas de ligação ao antigénio CD25.

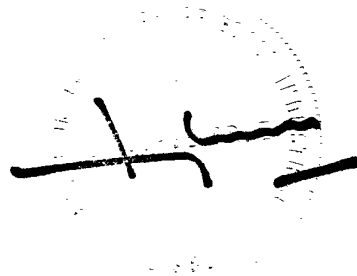
Na cirurgia de transplante de órgãos, particularmente cirurgia de transplante de rim, fígado, coração, pulmão e medula óssea, é necessário suprimir o sistema imune do recipiente do enxerto para minimizar a probabilidade de rejeição do enxerto após cirurgia. Para esta finalidade foram propostas várias drogas imuno-supressoras mas a sua utilização tem de ser cuidadosamente controlada uma vez que para além dos efeitos secundários indesejáveis que surgem da utilização de certos agentes imuno-supressores existe também a dificuldade de a acção imuno-supressora tornar o recipiente do enxerto particularmente susceptível à infecção por bactérias e vírus que seriam controláveis por um sistema imune normal. Agentes imuno-supressores que têm sido usados com êxito na prática clínica incluem esteróides, azatioprina e ciclosporina A. É necessário na prática clínica tentar equilibrar o grau de imuno-supressão necessário para evitar ou tratar os casos de rejeição de enxertos com retenção de uma certa quantidade do sistema imune do recipiente para combater outros agentes infecciosos e ao mesmo tempo manter sob controle quaisquer efeitos secundários indesejáveis.

Para além da utilização de drogas imuno-supressoras, também se tem focado a atenção na utilização de certos anticorpos monoclonais (MAbs) para suprimir as reacções imunes, em particular tem sido dispensada atenção aos anticorpos monoclonais que reconhecem vários antigénios de superfície de células T. Aqui também foram encontrados problemas na prática clínica, nomeadamente os anticorpos de trabalhos anteriores eram muito fortes ou pouco eficazes e algumas vezes causaram efeitos secundários graves tais como febre alta.

Estes MAb's são geralmente designados por um número CD ("Cluster Determination") atribuído pelas sucessivas reuniões de tipagem de leucócitos. Se bem que um termo como CD3 seja frequentemente aplicado ao antigénio de superfície celular e um MAb contra este antigénio seja muitas vezes descrito como "anti-CD3", na descrição que se segue termos tais como CD3, CD25, etc. serão aplicados a MAbs e os correspondentes antigénios de superfície celular serão descritos como "antigénio CD3", etc.

Em particular, anticorpos monoclonais contra antigénios de membrana presentes em todas as células T (também designados antigénios "pan" de células T) tais como o antigénio CD3 são anticorpos muito potentes por possuírem uma actividade supressora global no sistema imune. Portanto, o corpo humano pode ser privado da resposta imune imediata geralmente mediada por células T de memória quando ocorre uma infecção. Certamente isto não é desejável quando se tenta prevenir em vez de curar os casos de rejeição de enxertos. Um tratamento adequado para usar na profilaxia deverá ser essencialmente selectivo, i.e. o conjunto de células T de memória deverá manter-se intacto ao mesmo tempo que a categoria de células T (células T activadas) que poderão estar directamente envolvidas num caso de rejeição deverão ser inactivadas.

Este objectivo pode ser conseguido usando anticorpos contra células T activadas. Estas células T são caracterizadas pela presença de receptores de IL-2 de alta afinidade na sua superfície membranar. O receptor de IL-2 de alta afinidade é composto por pelo menos duas cadeias polipeptídicas diferentes, uma cadeia α também conhecida como antigénio CD25 e uma cadeia β . As células T em repouso não expressam este receptor de alta afinidade mas antes receptores de afinidade baixa e intermédia que consistem em homodímeros da cadeia α ou β . Um anticorpo CD25 que



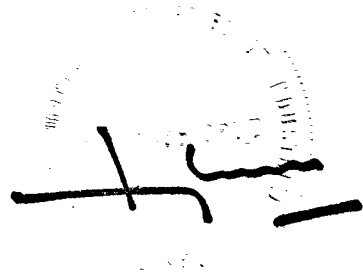
- 4 -

interfere com a ligação de IL-2 ao seu receptor de alta afinidade e portanto suprime selectivamente a resposta imune, é um anticorpo de eleição para a profilaxia de rejeição de enxertos.

As imunoglobulinas ou anticorpos naturais compreendem uma molécula multimérica em forma de Y tendo um sítio de ligação ao antigénio no extremo de cada braço superior. A restante estrutura, em particular o pé do Y medeia funções efectoras associadas às imunoglobulinas. A estrutura geral de um anticorpo a classe IgG está apresentada esquemáticamente na Figura 1A. Tanto a cadeia pesada como a leve compreendem um domínio variável e uma parte constante. Um sítio de ligação ao antigénio consiste no domínio variável de uma cadeia pesada associado ao domínio variável de uma cadeia leve. Os domínios variáveis das cadeias pesada e leve têm a mesma estrutura geral que está ilustrada na Figura 1B.

Mais particularmente, as características de ligação ao antigénio de um anticorpo são essencialmente determinadas por 3 regiões específicas no domínio variável das cadeias pesada e leve que são designadas regiões hipervariáveis ou regiões determinantes de complementaridade (CDRs). Como se mostra na Figura 1B, estas três regiões hipervariáveis alternam com 4 regiões estruturais (FRs) cujas sequências são relativamente conservadas e não estão directamente envolvidas na ligação. As CDRs formam ansas e são mantidas em estreita proximidade pelas regiões estruturais que adoptam uma conformação em folha β . As CDRs de uma cadeia pesada juntamente com as CDRs da cadeia leve associada essencialmente constituem o sítio de ligação ao antigénio da molécula do anticorpo.

A determinação daquilo que constitui uma FR ou uma região CDR é geralmente feito por comparação da sequência de

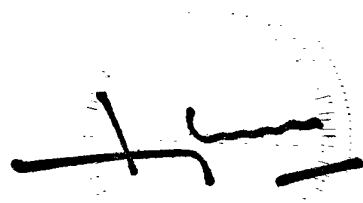


aminoácidos de uma série de anticorpos induzidos na mesma espécie. As regras gerais para a identificação das regiões de CDR e FR estão apresentadas na Tabela I.

Ainda, foi recentemente encontrado que a contribuição feita por um domínio variável da cadeia leve para a energia de ligação é pequena comparado com a contribuída pelo domínio variável da cadeia pesada associada e que os domínios variáveis da cadeia pesada isolados possuem uma actividade de ligação ao antigénio própria. Tais moléculas são agora normalmente referidas como anticorpos de domínios simples.

Já existem vários MAb's CD25 murinos e incluem 33B3-1 (Immunotech-Merieux), BD α IL-2R (Becton-Dickinson), 2C8 (Amersham), Campath 5 (MRC, Cambridge) e ATH207 (Universidade livre, Berlin). No entanto, encontrou-se agora que um novo anticorpo CD25 de murgancho do isotipo IgG2a, daqui em diante designado RFT5-IgG2a, tem melhores propriedades do os anticorpos CD25 dos trabalhos anteriores especialmente no que respeita à afinidade de ligação e que é possível construir outras moléculas de ligação CD25 tendo as mesmas regiões hipervariáveis de RFT5-IgG2a.

Assim o invento proporciona uma molécula de ligação a CD25 que compreende pelo menos um sítio de ligação a antigénio compreendendo pelo menos um domínio que compreende em sequência, as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3; o referido CDR1 tendo a sequência de aminoácidos Arg-Tir-Trp-Met-His, o referido CDR2 tendo a sequência de aminoácidos Ala-Ile-Tir-Pro-Gli-Asn-Ser-Asp-Tre-Ser-Tir-Asn-Gln-Lis-Fen-Glu-Gli e o referido CDR3 tendo a sequência de aminoácidos Asp-Tir-Gli-Tir-Tir-Fen-Asp-Fen; e seus equivalentes directos.



Num primeiro aspecto do invento, a molécula de ligação a CD25 compreende um sítio de ligação a antigénio simples compreendendo um domínio simples.

Num segundo aspecto do invento, a molécula de ligação a CD25 compreende pelo menos um sítio de ligação a antigénio compreendendo:

- a) um primeiro domínio compreendendo em sequência as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3; o referido CDR1 tendo a sequência de aminoácidos Arg-Tir-Trp-Met-His, o referido CDR2 tendo a sequência de aminoácidos Ala-Ile-Tir-Pro-Gli-Asn-Ser-Asp-Tre-Ser-Tir-Asn-Gln-Lis-Fen-Glu-Gli e o referido CDR3 tendo a sequência de aminoácidos Asp-Tir-Gli-Tir-Tir-Fen-Asp-Fen e
- b) um segundo domínio compreendendo em sequência as regiões hipervariáveis CDR1', CDR2' e CDR3', o referido CDR1' tendo a sequência de aminoácidos Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tir-Mat-Gln, o referido CDR2' tendo a sequência de aminoácidos Asp-Tre-Ser-Lis-Leu-Ala-Ser e o referido CDR3' tendo a sequência de aminoácidos His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tir-Tre;

e seus equivalentes directos.

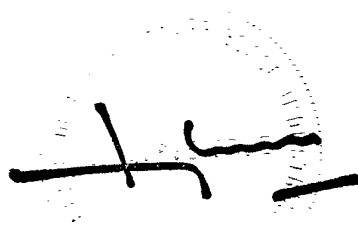
A menos que de outra forma seja indicado, qualquer cadeia polipeptídica é daqui em diante descrita como tendo uma sequência de aminoácidos começando na extremidade N e terminando na extremidade C.

Quando o sítio de ligação ao antigénio compreende os primeiro e segundo domínios, estes podem estar situados na mesma molécula polipeptídica ou, de preferência cada domínio pode estar

numa cadeia diferente, o primeiro domínio sendo parte de uma cadeia pesada de imunoglobulina ou seu fragmento e o segundo domínio sendo parte de uma cadeia leve de imunoglobulina ou de um seu fragmento.

Por "molécula de ligação a CD25" pretende-se significar qualquer molécula capaz de se ligar ao antigénio CD25 sózinha ou associada a outras moléculas para formar receptores IL-2 de alta afinidade. A reacção de ligação pode ser mostrada por métodos convencionais (ensaios qualitativos) incluindo, por exemplo, um bioensaio para determinação da inibição da ligação de IL-2 ao seu receptor ou quaisquer tipos de ensaios de ligação, com referência a um teste de controlo negativo em que é usado um anticorpo de especificidade não relacionada e.g. um anticorpo anti-lisozima. Vantajosamente, a ligação da molécula do invento ao antigénio CD25 pode ser mostrado num ensaio de ligação competitivo usando o anticorpo AHT207, BD α IL-2-R ou 33B3-1 como competidores. De preferência, o anticorpo AHT207 ou BD α IL-2-R será escolhido como competidor. Um exemplo particular de um ensaio de ligação está apresentado abaixo.

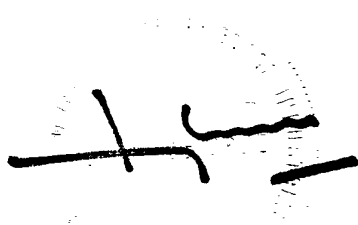
Células mononucleares de sangue periférico humano (HPBM) foram crescidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina, 25 mM bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal de vitela (FCS). 1 μ g/ml de fito-hemaglutinina (PHA) foi usado para estimular HPBM. Após 3 dias, os blastócitos foram ressuspensos numa concentração de 3×10^6 /ml em tampão de fosfatos salino suplementado com 2% de albumina sérica bovina (BSA) e 2% de azida. Amostras de 50 μ l desta suspensão foram incubadas durante 10 min a 20°C, em condições de não "capping", com concentrações graduais de um anticorpo bloqueador (competidor) de 1 a 100 μ g/ml. Em seguida 1 μ g/ml de anticorpo biotinilado do invento foi



adicionado às células e a incubação continuou durante 10 min. As células foram lavadas e ainda incubadas durante 10 min com estreptavidina marcada com fluoresceína. As células foram novamente lavadas, fixadas com formalina e analisadas com um fluorocitômetro que detecta a ligação do anticorpo biotinilado. Paralelamente, realizou-se uma experiência com um anticorpo biotinilado de uma especificidade não relacionada, como controlo negativo.

Exemplos de moléculas de ligação a antígeno incluem anticorpos tais como os produzidos pelas células B ou hibridomas e anticorpos quiméricos ou humanizados ou qualquer fragmento deles, e.g. F(ab')₂ e fragmentos Fab, assim como anticorpos de cadeia imple ou anticorpos com domínios simples.

Um anticorpo de cadeia simples consiste em domínios variáveis das cadeias pesada e leve de um anticorpo covalentemente ligadas por um ligante peptídico geralmente consistindo em 10 a 30 aminoácidos, de preferência entre 15 e 25 aminoácidos. Portanto tal estrutura não inclui a parte constante das cadeias pesada e leve e pensa-se que o espaçador peptídico pequeno seja menos antigénico do que a parte constante total. Por "anticorpo quimérico" pretende-se significar um anticorpo em que as regiões constantes das cadeias pesada e leve ou ambas são de origem humana enquanto os domínios variáveis das cadeias pesada e leve são de origem não humana (e.g. murina). Por "anticorpo humanizado" pretende-se significar um anticorpo em que as regiões hipervariáveis (CDRs) são de origem não humana (e.g. murina), enquanto que todas ou quase todas as outras partes da imunoglobulina e.g. as regiões constantes e as partes altamente conservadas dos domínios variáveis, i.e. as regiões estruturais são de origem humana. Um anticorpo humanizado pode no entanto reter alguns aminoácidos da sequência murina nas partes das regiões estruturais adjacentes às regiões hipervariáveis.



As regiões hipervariáveis podem estar associadas com quaisquer tipos de regiões estruturais, de preferência de origem murina ou humana. Regiões estruturais adequadas estão descritas em "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat E.A. et al., US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health. No entanto, a estrutura de cadeia pesada preferida é a de RFT5-IgG2a, que está apresentada na Seq. Id. N21. Ela consiste na sequência das regiões FR1, FR2, FR3 e FR4. De forma semelhante, Seq. Id. N22 mostra a estrutura de cadeia leve preferida RFT5-IgG2a que consiste na sequência das regiões FR1', FR2', FR3' e FR4'.

Assim o invento também proporciona uma molécula de ligação a CD25 que compreende pelo menos um sítio ligação a antigénio compreendendo um primeiro domínio tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à apresentada em Seq. ID. N21 começando com o aminoácido na posição 1 e terminando com o aminoácido na posição 117 ou um primeiro domínio como descrito atrás e um segundo domínio tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à mostrada em Seq. Id. N22, começando com o aminoácido na posição 104.

Os anticorpos monoclonais induzidos contra uma proteína naturalmente encontrada em todos os humanos deve necessariamente ser desenvolvida num sistema não humano e.g. em murganhos. Como uma consequência directa disto um anticorpo xenogénico como o produzido por hibridomas, quando administrado a humanos, induz uma resposta imune indesejável que é predominantemente mediada pela parte constante da imunoglobulina xenogénica. Isto limita claramente a utilização de tais anticorpos uma vez que eles não podem ser administrados durante um período de tempo prolongado. Portanto é particularmente preferido usar anticorpos de cadeia simples, de domínio simples, quiméricos ou humanizados que tenham

menos probabilidade de induzir uma resposta alogénica substancial quando administrados a humanos.

Face ao que foi dito, uma molécula de ligação a CD25 preferida do invento foi seleccionada a partir de um anticorpo quimérico anti-CD25 que compreende pelo menos

- a) uma cadeia pesada de imunoglobulina ou seu fragmento que compreende (i) um domínio variável compreendendo sequencialmente as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3 e (ii) a parte constante ou seu fragmento de uma cadeia pesada humana; a referida CDR1 tendo a sequência de aminoácidos Arg-Tir-Trp-Met-His, a referida CDR2 tendo a sequência de aminoácidos Ala-Ile-Tir-Pro-Gli-Asn-Ser-Asp-Tre-Ser-Tir-Asn-Gln-Lis-Fen-Glu-Gli e a referida CDR3 tendo a sequência de aminoácidos Asp-Tir-Gli-Tir-Tir-Fen-Asp-Fen e
- b) uma cadeia leve de imunoglobulina ou seu fragmento que compreende (i) um domínio variável compreendendo sequencialmente as regiões hipervariáveis CDR1', CDR2' e CDR3' e (ii) a parte constante ou seu fragmento de uma cadeia leve humana; a referida CDR1' tendo a sequência de aminoácidos Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tir-Met-Gln, a referida CDR2' tendo a sequência de aminoácidos Asp-Tre-Ser-Lis-Leu-Ala-Ser e a referida CDR3' tendo a sequência de aminoácidos His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tir-Tre;

e seus equivalentes directos.

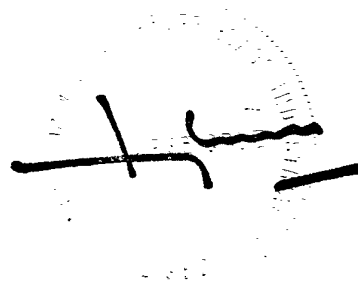
Como alternativa, uma molécula de ligação a CD25 do invento pode ser seleccionada a partir de uma molécula de ligação de cadeia simples que compreende um sítio de ligação ao antigénio compreendendo

- a) um primeiro domínio compreendendo sequenciadamente as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3, as referidas regiões hipervariáveis tendo as sequências de aminoácidos mostradas na Seq. Id. N21,
- b) um segundo domínio compreendendo sequenciadamente as regiões hipervariáveis CDR1', CDR2' e CDR3', as referidas regiões hipervariáveis tendo as sequências de aminoácidos como se mostra em Seq. Id. N22 e
- c) um ligante peptídico que se liga à extremidade N-terminal do primeiro domínio e à extremidade C-terminal do segundo domínio ou à extremidade C-terminal do primeiro domínio e à extremidade N-terminal do segundo domínio;

e seus equivalentes directos.

Como é do conhecimento geral, alterações menores numa sequência de aminoácidos tais como deleções, adições ou substituições de um ou vários aminoácidos pode conduzir a uma forma alélica da proteína original que tem substancialmente propriedades idênticas. Assim, pelo termo "seus equivalentes directos" pretende-se significar qualquer molécula de ligação a CD25 de domínio simples (molécula X)

- (i) em que as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3 tomadas como um todo são pelo menos 80% homólogas, de preferência pelo menos 90% homólogas, mais preferencialmente pelo menos 95% homólogas das regiões hipervariáveis como se mostra na Seq. Id. N21 e
- (ii) que é capaz de inibir a ligação de IL-2 ao seu receptor substancialmente no mesmo grau que uma molécula referência



tendo regiões estruturais idênticas às da molécula X mas tendo regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3 idênticas às mostradas em Seq. Id. N°1;

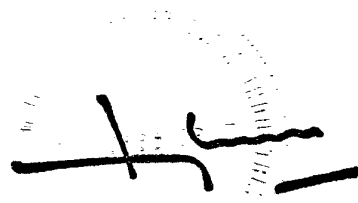
ou qualquer molécula de ligação a CD25 tendo pelo menos dois domínios por sítio de ligação (molécula X')

- (i) em que as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' e CDR3' consideradas como um conjunto são pelo menos 80% homólogas, de preferência pelo menos 95% homólogas das regiões hipervariáveis como se mostra na Seq. Id. N°1 e 2 e
- (ii) que é capaz de inibir a ligação de IL-2 ao seu receptor substancialmente no mesmo grau que uma molécula referência tendo regiões estruturais idênticas às da molécula X' mas tendo regiões hipervariáveis CDR1, CDR2, CDR3, CDR1', CDR2' e CDR3' idênticas às mostradas em Seq. Id. N°1 e 2;

Este último critério pode ser convenientemente testado em vários ensaios incluindo um bioensaio de Reacção de Linfócitos Mistos (MLR), um bioensaio de resposta de HPBM específica para um antígeno e um bioensaio de proliferação de linfoblastos T dependentes de IL-2. Tais ensaios são aqui descritos no texto que se segue. Pelo termo "no mesmo grau" pretende-se significar que as moléculas referência e seus equivalentes apresentam numa base estatística curvas de inibição de ligação a IL-2 essencialmente idênticas num dos bioensaios referidos atrás.

Mais preferencialmente, o anticorpo quimérico CD25 compreende pelo menos

- a) uma cadeia pesada que compreende um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à mostrada em Seq. Id. N° 1 começando com o aminoácido na



posição 1 e terminando com o aminoácido na posição 117 e a parte constante de uma cadeia pesada humana; e

- b) uma cadeia leve que compreende um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à mostrada em Seq. Id. N22 começando com ácido glutâmico na posição 1 e terminando com ácido glutâmico na posição 104 e a parte constante de uma cadeia leve humana.

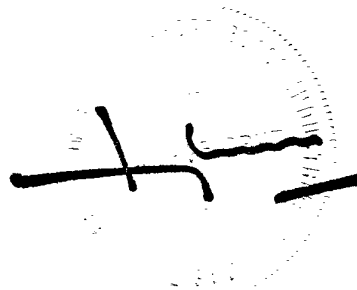
A parte constante de uma cadeia pesada humana pode ser do tipo Γ_1 , Γ_2 , Γ_3 , Γ_4 , μ , α_1 , α_2 , δ ou ϵ , de preferência do tipo Γ , mais preferencialmente do tipo #1, enquanto que a parte constante de uma cadeia leve humana pode ser do tipo k ou λ (o qual inclui os subtipos λ_1 , λ_2 e λ_3) mas é preferencialmente do tipo k . A sequência de aminoácidos de todas estas partes constantes estão apresentadas em Kabat et al. (supra).

Os conjugados das moléculas de ligação a CD25 do invento, e.g. conjugados de enzima ou toxina ou radioisótopo, estão também incluídos dentro do âmbito do invento.

Uma molécula de ligação a CD25 do invento pode ser produzida por técnicas de DNA recombinante do invento. Face a isto, uma ou mais moléculas de DNA codificadoras da molécula de ligação devem ser construídas, colocadas sob o controle de sequências adequadas e transferidas para um organismo hospedeiro adequado à expressão.

Numa forma geral, são pois proporcionadas

- (i) moléculas de DNA codificadoras de uma molécula de ligação a CD25 com um domínio simples do invento, uma molécula de ligação a CD25 de cadeia simples do invento, uma cadeia



pesada ou leve ou seus fragmentos de uma molécula de ligação a CD25 do invento e

(ii) a utilização das moléculas de DNA do invento para a produção de uma molécula de ligação a CD25 do invento por meios recombinantes.

O estado actual dos conhecimentos é tal que os familiarizados com a matéria serão capazes de sintetizar moléculas de DNA do invento tendo presente a informação aqui proporcionada i.e. as sequências de aminoácidos das regiões hipervariáveis e as sequências de DNA que as codificam. Um método para a construção de um gene do domínio variável está descrito por exemplo em EPA 239 400 e pode ser brevemente resumido como se segue: Um gene codificador de um domínio variável de um MAb de qualquer especificidade é clonado. Os segmentos de DNA codificadores das regiões estruturais e hipervariáveis são determinados e os segmentos de DNA codificadores das regiões hipervariáveis são removidos de forma a que os segmentos de DNA codificadores das regiões estruturais sejam fundidos uns aos outros com sítios de restrição adequados nas junções. Os sítios de restrição podem ser gerados nas posições adequadas por mutagénese da molécula de DNA através de processos convencionais. As cassetes CDR sintéticas de cadeia dupla são preparadas por síntese de DNA de acordo com as sequências apresentadas em Seq. Id. Nº 1 ou 2. Estas cassetes são proporcionadas com extremos coesivos de forma a que possam ser ligadas nas junções da parte estrutural. Na Figura 5 está apresentado um protocolo para se conseguir uma molécula de DNA codificadora de um domínio variável de imunoglobulina.

Ainda, não é necessário ter acesso ao mRNA de uma linha de células de hibridoma produtora para se obter uma construção de DNA codificadora dos MABs do invento. Assim, o pedido PCT W0

90/07861 dá instruções completas para a produção de um MAb por técnicas de DNA recombinante dando apenas as informações escritas da sequência de nucleótidos do gene. O método compreende a síntese de uma série de oligonucleótidos, a sua amplificação pelo método PCR e o seu "splicing" para dar a sequência de DNA pretendida.

Vectores de expressão compreendendo um promotor adequado ou genes codificadores das partes constantes da cadeia leve e pesada estão disponíveis ao público. Assim, uma vez preparada uma molécula de DNA do invento ela pode ser convenientemente transferida num vector de expressão adequado. As moléculas de DNA codificadoras de anticorpos de cadeia simples podem também ser preparadas por métodos convencionais, por exemplo, como descrito em WO 88/1649.

Face ao que foi dito e uma vez que o MAb de murganho tal como naturalmente secretado pelo hibridoma não é o tipo preferido de MAb, pensa-se que não seja necessário nenhum depósito de hibridoma para satisfazer os critérios da descrição.

Numa realização particular do invento, os meios recombinantes para a produção de uma molécula de ligação a CD25 incluem as primeira e segunda construções de DNA como descrito abaixo:

A primeira construção de DNA codifica uma cadeia pesada ou seu fragmento e compreende

- a) uma primeira parte que codifica um domínio variável compreendendo alternadamente regiões estruturais e hipervariáveis, as referidas regiões hipervariáveis sendo em sequência CDR1, CDR2 e CDR3 as sequências de aminoácidos das quais

estão apresentadas em Seq. Id. N21; esta primeira parte começando com um codão codificador do primeiro aminoácido do domínio variável e terminando com um codão codificador do último aminoácido do domínio variável e

- b) uma segunda parte codificadora de uma parte constante da cadeia pesada ou seu fragmento que começa com um codão codificador do primeiro aminoácido da parte constante da cadeia pesada e termina com um codão codificador do último aminoácido da parte constante ou seu fragmento seguido de um codão sem sentido.

De preferência, esta primeira parte codifica um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos mostrada em Seq. Id. N21 começando com o aminoácido na posição 1 e terminando com o aminoácido na posição 117. Mais preferencialmente a primeira parte tem a sequência de nucleótidos como se mostra em Seq. Id. N21 começando com o nucleótido na posição 142 e terminando com o nucleótido na posição 492. Também preferencialmente, a segunda parte codifica a parte constante de uma cadeia pesada humana, mais preferencialmente a parte constante da cadeia H1 humana. Esta segunda parte pode ser um fragmento de DNA de origem genômica (compreendendo intrões) ou um fragmento de cDNA (sem intrões).

Uma segunda construção de DNA codifica uma cadeia leve ou seu fragmento e compreende

- a) uma primeira parte que codifica um domínio variável compreendendo alternadamente regiões estruturais e hipervariáveis, as referidas regiões hipervariáveis sendo em sequência CDR1', CDR2' e CDR3' as sequências de aminoácidos das quais estão apresentadas em Seq. Id. N22; esta primeira parte

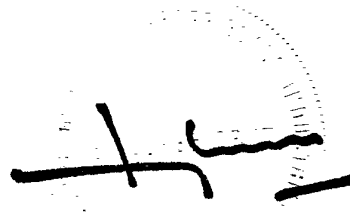
começando com um codão codificador do primeiro aminoácido do domínio variável e terminando com um codão codificador do último aminoácido do domínio variável e

- b) uma segunda parte codificadora de uma parte constante da cadeia pesada ou seu fragmento que começa com um codão codificador do primeiro aminoácido da parte constante da cadeia leve e termina com um codão codificador do último aminoácido da parte constante ou seu fragmento seguido de um codão sem sentido.

De preferência, esta primeira parte codifica um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos mostrada em Seq. Id. N°2 começando com o aminoácido na posição 1 e terminando com o aminoácido na posição 104. Mais preferencialmente a primeira parte tem a sequência de nucleótidos como se mostra em Seq. Id. N°2 começando com o nucleótido na posição 244 e terminando com o nucleótido na posição 555. Também preferencialmente, a segunda parte codifica a parte constante de uma cadeia leve humana, mais preferencialmente a parte constante da cadeia k humana.

Na primeira e segunda construções a primeira e segunda parte estão preferencialmente separadas por um intrão. No intrão localizado entre a primeira e segunda parte preferencialmente é inserido um potenciador. A presença deste elemento genético que é transcrito mas não traduzido pode ser necessário para uma transcrição eficaz da segunda parte. Mais preferencialmente a primeira e segunda construções de DNA compreendem o potenciador de um gene de cadeia pesada vantajosamente de origem humana.

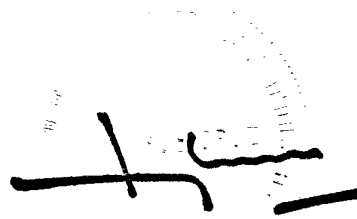
A primeira ou segunda construção de DNA vantajosamente compreende uma terceira parte que está situada a montante da



primeira parte e que codifica parte de um peptídeo líder; esta terceira parte começando com o códon codificador do primeiro aminoácido e terminando com o último aminoácido do peptídeo líder. Este peptídeo é necessário para a secreção das cadeias pelo organismo hospedeiro em que elas são expressas e é subsequentemente removido pelo organismo hospedeiro. De preferência, a terceira parte da primeira construção de DNA codifica um peptídeo líder tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à sequência de aminoácidos que se mostra em Seq. Id. N°1, começando com o aminoácido na posição -19 e terminando com o aminoácido na posição -1. Também preferencialmente, a terceira parte da segunda construção de DNA codifica um peptídeo líder tendo uma sequência de aminoácidos como se mostra em Seq. Id. N°2, começando com o aminoácido na posição -22 e terminando com o aminoácido na posição -1.

Cada uma das construções de DNA foi colocada sob o controle de sequências de controle adequadas, em particular sob o controle de um promotor adequado. Pode ser usado qualquer tipo de promotor, desde que ele seja adaptado ao organismo hospedeiro para o qual as construções de DNA são transferidas para expressão. No entanto, se a expressão tomar lugar numa célula de mamífero, é particularmente preferido usar o promotor de um gene de imunoglobulina.

O anticorpo pretendido pode ser produzido numa cultura celular ou num animal transgênico. Um animal transgênico adequado pode ser obtido segundo métodos convencionais que incluem micro-injeção em ovos das primeira e segunda construções de DNA colocadas sob o controle de sequências reguladoras adequadas, transferência dos ovos assim preparados para fêmeas pseudo-grávidas adequadas e selecção de um descendente expressando o anticorpo pretendido.



Quando as cadeias de anticorpos têm de ser produzidas numa cultura celular, as construções de DNA devem ser primeiro inseridas num único vector de expressão ou em dois separados mas compatíveis, sendo esta última possibilidade a preferida.

Assim, o invento também proporciona um vector de expressão capaz de se replicar numa linha celular procariótica ou eucariótica que compreende pelo menos uma das construções de DNA atrás descritas.

Cada um dos vectores de expressão contendo uma construção de DNA foi então transferido para um organismo hospedeiro adequado. Quando as construções de DNA foram separadamente inseridas em dois vectores de expressão, elas podem ser transferidas separadamente, i.e. um tipo de vector por célula ou co-transfectados, esta última possibilidade é a preferida. Um organismo hospedeiro adequado pode ser uma bactéria, uma levedura ou uma linha celular de mamífero, esta última sendo a preferida. Mais preferencialmente, a linha de células de mamífero é de origem linfóide e.g. um mieloma, hibridoma ou uma célula B normal imortalizada, mas que não expresse qualquer cadeia pesada ou leve de anticorpo endógeno.

É também preferido que o organismo hospedeiro contenha um grande número de cópias dos vectores por célula. Se o organismo hospedeiro for uma linha de células de mamífero, este objectivo pode ser conseguido por amplificação do número de cópias de acordo com métodos convencionais. Os métodos de amplificação geralmente consistem na selecção de resistência crescente a uma droga, a referida resistência sendo codificada pelo vector de expressão.

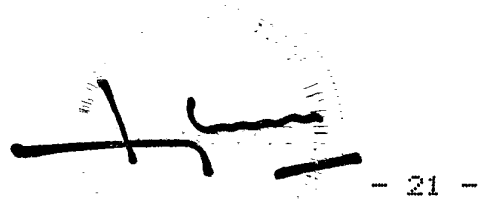
Num outro aspecto do invento, é proporcionado um processo para a produção de uma molécula de ligação a CD25 com várias cadeias que compreende (i) cultura de um organismo que foi transformado com as primeira e segunda construções de DNA do invento e (ii) recuperação de uma molécula de ligação a CD25 activa a partir da cultura.

Como alternativa, as cadeias pesada e leve podem ser recuperadas separadamente e reconstituídas numa molécula de ligação activa após reenrolamento in vitro. Os métodos de reconstituição são bem conhecidos; Exemplos dos métodos são proporcionados particularmente em EPA 120 674 ou em EPA 125 023.

Assim um processo pode também compreender

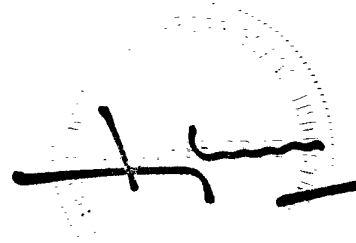
- (i) cultura de um primeiro organismo que foi transformado com uma primeira construção de DNA do invento e recuperação da referida cadeia pesada ou seu fragmento a partir da cultura e
- (ii) cultura de um segundo organismo que foi transformado com uma segunda construção de DNA do invento e recuperação da referida cadeia leve ou seu fragmento a partir da cultura e
- (iii) reconstituição in vitro de uma molécula activa de ligação a CD25 a partir da cadeia leve ou seu fragmento obtido em (i) e da cadeia leve ou seu fragmento obtido em (ii).

De forma semelhante, é proporcionado um processo para a produção de uma molécula de ligação a CD25 com um único domínio que compreende (i) cultura de um organismo que foi transformado com uma construção de DNA respectivamente codificadora de uma molécula de ligação a CD25 de cadeia simples ou de domínio

A handwritten signature in black ink is positioned above the page number. The signature consists of several fluid, connected strokes. To the right of the signature, the page number '- 21 -' is printed in a simple, sans-serif font.

simples do invento e (ii) recuperação da referida molécula a partir da cultura.

As moléculas de ligação a CD25 do invento apresentam muito boa actividade imunomoduladora como se mostra por exemplo num bioensaio de reacção de linfócitos mistos (MRL) (Akbar et al., J. Immunol. 140, 2171-8). A MLR é geralmente considerada como sendo o equivalente in vitro da resposta a transplantes alogeneicos que conduz à rejeição in vivo.



1. Inibição da MLR

A partir de uma preparação de HPBM de um primeiro dador fizeram-se amostras de 100 μ l contendo 10^5 HPBM aos quais se adicionou várias concentrações de uma molécula do invento variando entre 0 e 300 ng/ml (incluindo estes valores limites). Em seguida cada uma das amostras foi misturada com uma amostra de 100 μ l contendo 10^5 HPMB HLA-incompatíveis irradiadas com raios X de um segundo dador ou HPBM sem células T. A mistura foi incubada durante 6 dias a 37°C e adicionado 1 μ Ci de metil- 3 H-timidina (3 H-Tdr) num volume de 10 μ l. Após 6 horas, a proliferação celular foi medida por incorporação de radioactividade.

Neste ensaio particular, as moléculas do invento apresentam uma actividade imunomoduladora in vitro em concentrações a partir de aproximadamente 0,3 ng/ml, como se mostra na Figura 6. 50% do crescimento celular é inibido a cerca de 3 ng/ml.

A actividade imunomoduladora das moléculas do invento pode também ser calculada medindo a inibição da resposta de HPBL específica de antígeno ou a inibição da proliferação de linfoblastos T dependente de IL-2 como se segue:

2. Inibição da resposta de HPBM específica de antígeno

As moléculas do invento inibem eficazmente a geração de uma resposta de células T restringida a HLA classe II específica de PPD (tuberculina₉, indicando a sua capacidade para inibir a ligação de IL-2 produzida endogenamente ao seu receptor. In vivo espera-se que estas respostas específicas de antígeno desempenhem um papel crucial na iniciação de auto-imunidade e rejeição de transplantes.

A partir de uma preparação de HPBM prepararam-se amostras de 100 μ l contendo 10^5 HPBM às quais se adicionou várias concentrações de uma molécula do invento variando entre 0 a 300 ng/ml (incluindo estes valores limites) e tuberculina (PPD) numa concentração final de 30 μ g/ml. As amostras foram incubadas durante 6 dias a 37°C e adicionou-se então 1 μ Ci de metil- 3 H-timidina num volume de 10 μ l. Após 6 horas de incubação a proliferação celular foi medida por incorporação de radioactividade.

Neste ensaio particular, as moléculas do invento apresentam uma actividade imunomoduladora entre cerca de 10 ng/ml como se mostra na Figura 7. 50% do crescimento celular é inibido a cerca de 50 ng/ml.

3. Inibição da proliferação de linfoblastos T dependentes de IL-2

As moléculas do invento inibem eficazmente o crescimento de blastócitos T humanos dependentes de IL-2 induzidos por estimulação com MLR ou PPD. Espera-se que estas células desempenhem um papel importante na cronicidade de casos de autoimunidade e de rejeição.

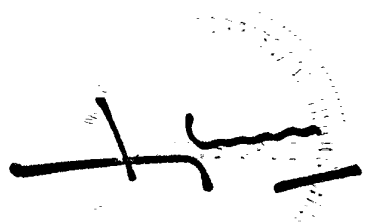
Culturas em triplicado contendo 20×10^3 HPBM com 5 dias estimulados com PPD ou MLR num volume final de 200 μ l foram incubadas a 37°C durante 48 horas na presença de 5, 10 ou 20 ng/ml de IL-2 recombinante e uma molécula do invento em várias concentrações variando entre 0 e 10 μ g/ml (incluindo estes valores limites). Em seguida adicionou-se 3 H-Tdr. Após 6 horas, a proliferação celular foi medida por incorporação de radioactividade. Neste ensaio particular as moléculas do invento apresentam uma actividade imunomoduladora em concentrações a partir de 0,1 μ g/ml como se mostra nas Figuras 8A e 8B, 8C e 8D.

Assim o invento também proporciona

- (i) a utilização de uma molécula de ligação a CD25 do invento em imuno-supressão de um sistema imune humano
- (ii) um método de imuno-supressão do sistema imune humano que se caracteriza pela administração de uma quantidade imuno-supressora eficaz de uma molécula de ligação a CD25 do invento a um doente necessitado de tal tratamento.
- (iii) uma composição farmacéutica para imuno-supressão do sistema imune humano que compreende uma molécula de ligação a CD25 do invento e um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Em particular, uma molécula de ligação a CD25 do invento é útil na prevenção ou tratamento de casos de rejeição de enxertos.

Para estas indicações, a dosagem adequada dependerá certamente por exemplo do hospedeiro, do modo de administração e da natureza e gravidade do estado a ser tratado. No entanto, na utilização profilática, os resultados satisfatórios são geralmente indicados como sendo obtidos em dosagens diárias entre cerca de 0,1 mg e cerca de 1 mg por kilograma de peso de corpo. Estas dosagens deverão ser aumentadas até um factor de 4 para o tratamento de uma rejeição quando ela ocorre. Uma molécula do invento é convenientemente administrada parenteralmente, normalmente por via intravenosa, por exemplo na veia antecúbica ou outra veia periférica. Um tratamento profilático tipicamente compreende a administração da molécula do invento entre uma vez por dia e uma vez por semana durante 2 a 4 semanas, começando no dia do transplante, de preferência algumas horas antes do transplante.

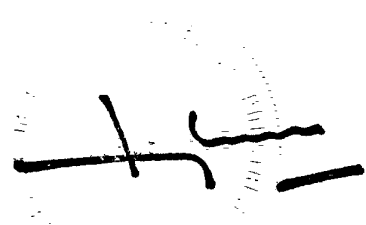


As moléculas do invento podem também ser úteis no tratamento de doenças que afectem células T que expressem o antigénio CD25, por exemplo no tratamento de leucémia de células T e de outras leucémias e linfomas. Com esta finalidade, a molécula de ligação a CD25 pode ser usada na forma de um radioconjugado em que a molécula é acoplada a um radionuclido emissor alfa.

As moléculas do invento podem também ser úteis no tratamento ou profilaxia da infecção por HIV. Parece que o vírus HIV requiere a proliferação de células T para se multiplicar e assim a inibição da proliferação de células T através do bloqueio do antigénio CD25 deverá também inibir a multiplicação do vírus.

As composições farmacêuticas do invento podem ser produzidas de forma convencional. Uma composição de acordo com o invento é de preferência proporcionada na forma liofilizada. Para a administração imediata ela é dissolvida num veículo aquoso adequado por exemplo água estéril para injeção ou soro fisiológico tamponado estéril. Se se considerar desejável fazer uma solução de maior volume para administração por infusão em vez de um bolus, é vantajoso incorporar albumina de soro humano ou o próprio sangue heparinizado do paciente em soro fisiológico na altura da formulação. A presença de um excesso de tal proteína fisiologicamente inerte evita a perda do anticorpo monoclonal por adsorção às paredes do recipiente e tubos usados com a solução de infusão. Se se usar albumina uma concentração adequada será 0,5 a 4,5% por peso da solução salina.

De acordo com um outro aspecto do invento, encontraram-se resultados particularmente bons através da utilização, em combinação, de pelo menos duas moléculas de ligação a antigénio a células T activadas, as referidas moléculas de ligação



reconhecendo pelo menos dois antigénios diferentes característicos de células T activadas.

De preferência pode ser usada uma combinação de duas moléculas diferentes de ligação a antigénio, cada uma delas reconhecendo um antigénio diferente. Assim, se bem que ambas as moléculas de ligação ao antigénio reconheçam antigénios de superfície de células T activadas, elas não competem uma com a outra para o mesmo sítio de ligação nas células T activadas.

De preferência uma das moléculas de ligação ao antigénio é uma molécula de ligação a CD25.

O presente invento também proporciona uma composição imuno-supressora compreendendo uma mistura de pelo menos uma molécula de ligação a CD25 e pelo menos uma molécula de ligação a antigénio contra pelo menos um antigénio diferente de CD25 que é característico de células T activadas.

O invento proporciona ainda pelo menos duas moléculas de ligação a antigénio contra células T activadas associadas umas à outra para usar na imuno-supressão do sistema de mamífero, as referidas moléculas de ligação a antigénio reconhecendo pelo menos dois antigénios diferentes característicos de células T activadas um dos quais é o antigénio CD25.

Por "molécula de ligação a antigénio contra células T activadas" pretende-se significar uma molécula de ligação que reage fortemente com células T activadas ao mesmo tempo que reage fracamente ou não reage mesmo com células T não activadas. De preferência as moléculas de ligação a antigénio são moléculas de imunoglobulina completa, mais preferencialmente anticorpos monoclonais murinos, quiméricos ou humanizados, particularmente

anticorpos monoclonais quiméricos. Os anticorpos monoclonais CD25 preferidos são os que possuem CDRs com a sequência de aminoácidos descritas atrás.

Vantajosamente, a composição do invento pode também incluir ou pode ser usado em combinação com uma droga imuno-supressora como seja a ciclosporina A.

Os anticorpos monoclonais preferidos contra antígenios de células T activadas diferentes de CD25 são tipicamente os classificados no conjunto de genes CD7 conforme estabelecido pelo Boston Workshop sobre "Leucocyte Typing II, Vol. I human T lymphocytes" por Reinherz, Haynes, Nadler e Berstein, Springer Verlag, 1985. O antígeno CD7 é heterogeneamente expresso em cerca de 80% de células T não activadas. No entanto, a expressão aumenta fortemente quando da activação (um aumento de 2-3 vezes na intensidade).

Uma combinação preferida de anticorpos é pois uma combinação de um anticorpo CD7 com um CD25. Assim, a composição do invento preferencialmente compreende uma mistura de pelo menos um anticorpo CD25 juntamente com pelo menos um anticorpo CD7, mais preferencialmente de um anticorpo CD25 juntamente com um anticorpo CD7. Também preferencialmente ambos os anticorpos são do isotipo IgG.

Os dois anticorpos, facultativamente juntamente com uma droga imuno-supressora, podem ser usados na prática clínica de várias formas. De preferência eles são misturados um com o outro e a mistura física é administrado ao doente. Um processo alternativo é a administração ao recipiente dos anticorpos e facultativamente a droga imuno-supressora a partir de reservatórios separados por qualquer ordem mas ao mesmo tempo. A composição

pode ser preparada e administrada parenteralmente como descrito atrás para o anticorpo CD25 sózinho. Como alternativa, a droga imuno-supressora é administrada oralmente e os anticorpos monoclonais são administrados parenteralmente, separadamente ou como uma mistura.

Para melhor se reconstituir composições adequadas, os anticorpos monoclonais e facultativamente uma droga imuno-supressora podem ser empacotados separadamente dentro da mesma embalagem, com instruções para a mistura ou concomitante administração. Exemplos de kits incluem por exemplo uma seringa com vários reservatórios ou uma embalagem contendo formas de dosagem unitárias separadas de pelo menos dois anticorpos contra células T activadas, os referidos anticorpos reconhecendo pelo menos dois antígenios diferentes característicos de células T activadas, um dos quais é o antígeno CD25.

Até agora as investigações indicaram que a administração dos anticorpos em combinação um com o outro e facultativamente com uma droga imuno-supressora é não origina efeitos secundários inaceitáveis nos níveis de dosagem empregues e que não existe potenciação dos efeitos secundários observados com os anticorpos individuais. Para usar na profilaxia, uma dosagem adequada requererá a administração de 0,05 a 0,5 miligramas de um primeiro anticorpo (como seja o anticorpo CD25) por kilograma de peso de corpo do doente e 0,05 a 0,5 miligramas de um segundo anticorpo (como seja um anticorpo CD7) por kilograma de peso de corpo. Quando a droga imuno-supressora é a ciclosporina, a quantidade recomendada de droga imuno-supressora que pode ser facultativamente vai de 2 a 5 miligramas por kilograma de peso de corpo quando administrado parenteralmente e 10-15 mg/Kg de peso de corpo quando administrado oralmente. A composição do invento

- 29 -

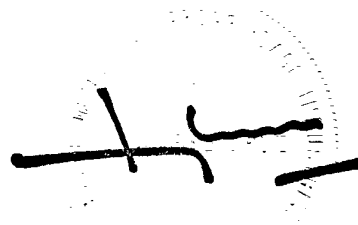
pode ser administrada numa base diária ou semanal, de preferência numa base semanal.

Se bem que a composição do invento se destine particularmente a usar em profilaxia da rejeição de enxertos, a sua utilização pode ser convenientemente estendida ao tratamento de casos de rejeição quando eles de facto ocorrem. Neste caso, a dosagem deverá ser aumentada até um factor de 4.

Os anticorpos monoclonais murinos adequados para usar no presente invento são conhecidos per se. Muitos anticorpos monoclonais contra antigénios de superfície de células T activadas podem ser adquiridos em colecções de culturas de vários países e especialmente a American Type Culture Collection de Rockville, Maryland, USA pode fornecer anticorpos monoclonais adequados ou hibridomas que secretem tais anticorpos. Um exemplo de hibridomas que secretem anticorpos monoclonais CD7 que possam ser usados no presente invento e que possam ser adquiridos à ATCC é T3-3A1. Outros anticorpos CD7 são RFT-2 e CHH 380 (um anticorpo quimérico). Os anticorpos CD25, para além do RFT-5 preferido e do seu derivado quimérico como descrito atrás, M7/2 (Gaulton et al., Clin. Immunol. and Immunopath. (1985) 36: 18); o anticorpo anti-tac (Uchiyama et al., J. Immunol. (1981) 126 (4): 1393); e o anticorpo monoclonal Campath 6.

O efeito sinérgico de uma combinação dos anticorpos monoclonais CD25 e CD7 foi demonstrado in vivo em testes clínicos em doentes humanos.

No bioensaio MLR, a inibição da incorporação de ³H-TdR é observada em culturas a que um anticorpo monoclonal CD7 (RFT2) ou CD25 (RFT5) foi adicionado isoladamente e existe um grau substancialmente mais alto de inibição quando ambos os anticorpos

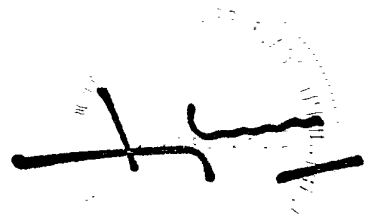


são usados simultaneamente na mesma concentração total. A MLR é o equivalente in vitro da resposta ao transplante alogénico que conduz à rejeição in vivo enquanto que a inibição descrita atrás é o equivalente à imunossupressão in vivo.

Em MLRs a que se adicionou ciclosporina numa gama de dosagem de 10 nanogramas/ml a 100 µg/ml, na presença dos anticorpos monoclonais CD7 ou CD25 observa-se uma maior inibição de ³H-TdR comparado com a ciclosporina sózinha em toda a gama de dosagem. A combinação de CD7, CD25 e ciclosporina apresenta um maior efeito inibidor do que qualquer outra combinação.

Em testes clínicos, os doentes que vão ser sujeitos a transplante de rim, fígado ou coração são seleccionados para terapia profilática. No dia do transplante, 2 horas antes da cirurgia é dada uma primeira infusão intravenosa do anticorpo quimérico CD25 do Exemplo 5 juntamente com o anticorpo quimérico CD7 (CHH 380) numa dose de 0,2 mg de cada anticorpo por Kg de peso de corpo. Dois dias após cirurgia administra-se uma infusão idêntica dos dois anticorpos e depois repete-se com intervalos semanais durante um mês.

As infusões intravenosas são preparadas como se segue: os anticorpos liofilizados são misturados uns com os outros e dispersos em 100 ml de soro fisiológico tamponado estéril contendo 4,5% peso de albumina bovina. Esta dispersão em soro fisiológico é administrada a doentes ao longo de um período de 30 minutos. Os doentes também recebem terapia convencional com ciclosporina. Nenhum doente sofreu um caso de rejeição durante um período de terapia de um mês.

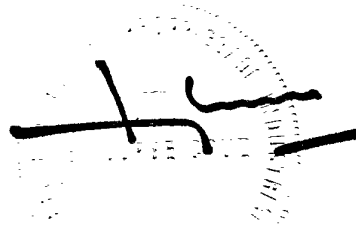


Breve descrição dos desenhos

A Figura 1A é um diagrama esquemático mostrando a estrutura de uma molécula de IgG assim como os genes codificadores das cadeias pesada e leve. A Figura 1B representa esquematicamente o arranjo de um domínio variável de uma cadeia pesada ou leve nas regiões estruturais (FR) e hipervariáveis (CDR).

As Figuras 2A e 2B mostram a análise de DNA genômico digerido com EcoRI do hibridoma de murganho RFT5-IgG2a (1), RFT5-IgG1 (2), RFT4 (3) e NS-1 (4) por transferência Southern usando uma sonda de DNA marcada com ^{32}P codificando o potenciador da cadeia pesada murina (Fig. 2A) ou codificando C_k de murganho e cinco segmentos do gen J_k (Fig. 2B). 10 μg de DNA genômico foram digeridos com EcoRI e fracionados pelo tamanho num gel de 0,8% de agarose. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose e hibridados com a sonda. Após lavagem, a membrana foi exposta durante a noite a um filme Kodak X-O Mat.

As Figuras 3A e 3B mostram os vetores de expressão parentais pSV2-neo-huCr1 e pSV2-DHFR-Eu-hu C_k . Ambos os plasmídeos compreendem um gene de resistência à ampicilina (amp^R) e a origem de replicação do pBR322 e SV40 (pBR322 ori e SV40 ori). pSV2-neo-hu $C_{\tau 1}$ caracteriza-se pela presença de um gene da neomicina (neo^R) e o gene codificador da parte constante $\tau 1$ humana (hu $C_{\tau 1}$), enquanto que pSV2-DHFR-Eu-hu C_k tem inserido um gene da di-hidrofolato-redutase (DHFR) (resistência ao metotrexato) e o gene codificador da parte constante K humana (hu C_k). Os vetores finais para a expressão da cadeia pesada ou leve quimérica são respectivamente obtidos por inserção em pSV2-neo-hCr1 de um fragmento de DNA codificador do peptídeo líder (L) e o domínio variável (VDJ $_2$) da cadeia pesada RFT5-IgG2a juntamente com o potenciador da cadeia pesada humana e por inserção em



pSV2-DHFR-E μ -h ψ ck de um fragmento de DNA codificador do peptídeo líder (L) e do domínio variável (VJ₂) da cadeia leve RFT5-IgG2a.

As Figuras 4A e 4B mostram a produtividade de conjuntos individuais de células cultivadas com concentrações crescentes de metotrexato (MTX) respectivamente de acordo com os processos A e B descritos no Exemplo 5. O eixo dos Y do gráfico dá a quantidade de anticorpo monoclonal produzido em mg/10⁹ células em 72 horas.

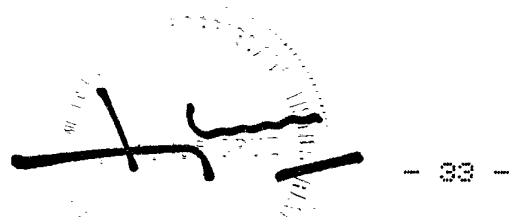
A Figura 5 mostra um protocolo para a construção de substituições de CDR por inserção das cassetes de CDR num vector contendo 4 regiões estruturais fundidas umas às outras.

A Figura 6 mostra a inibição de MLR por (x) RFT5-IgG2a (r_{2a}, k) e (o) um MAb quimérico murino-humano do invento (r₁, k). Ambos os MAb's têm os domínios variáveis como se mostra em Seq. Id. N^o 1 e 2.

A Figura 7 mostra a inibição da resposta de HPBM específica de PPD por (x) RFT5-IgG2a e (o) o mesmo MAb quimérico murino-humano.

A Figura 8 mostra o efeito de RFT5-IgG2a e do mesmo MAb quimérico murino-humano na proliferação de linfoblastos T com PPD, (Fig. 8B e 8A) e na proliferação de linfoblastos T de MRL, (Fig. 8D e 8C) numa concentração de IL-2 de 5 ng/ml (o), 10 ng/ml () e 20 ng/ml (x).

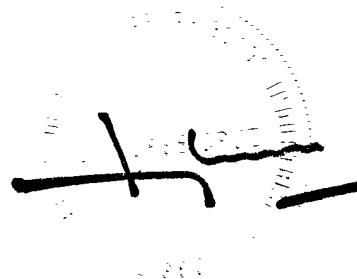
Apenas com fins ilustrativos a produção de um anticorpo CD25 quimérico do invento é exemplificada como se segue:



Exemplo 1 Clonagem do gene codificador do domínio variável da cadeia pesada de RFT5-IgG2a

O DNA genómico dos hibridomas RFT5-IgG2a (CD25; r2a; k), RFT5-IgG1 (CD25; r1; k) e RFT4; (CD4; r1, k) e da linha parental de células de mieloma dos hibridomas, nomeadamente NS-1, foi isolado e digerido com EcoRI. Cada um dos DNAs digeridos foi então fraccionado no mesmo gel de agarose. Após migração, o gel de agarose foi analisado por transferência Southern usando como sonda um fragmento de DNA XbaI-EcoRI de 0,7 kb marcado com ^{32}P o qual codifica o potenciador da cadeia pesada murina (Heinrich et al., J. Immunol. (1989) 143: 3589). Foram reveladas no gel 3 tipos de bandas após hibridação como se mostra na Figura 2. O fragmento EcoRI de 6,5 Kb está presente no produto de digestão do DNA de todas as linhas celulares incluindo NS-1, a linha celular parental de mieloma e portanto não tem interesse. O fragmento EcoRI de 2,9 Kb é detectado apenas no produto de digestão do DNA do hibridoma RFT5-IgG1 e pensa-se que seja o resultado de um rearranjo anormal de genes. O fragmento EcoRI de 6,8 Kb que está ausente no produto da digestão de DNA da linha celular parental NS-1 é pois um fragmento de eleição e posterior purificação deste fragmento foi subsequentemente realizada por electroforese em gel preparativo de agarose.

Fragmentos de DNA de aproximadamente 5-7 Kb foram clonados no sítio de restrição EcoRI do bacteriófago ZAP (Stratagene). Usando a sonda descrita atrás, foram despistados 6×10^6 fagos recombinantes e encontraram-se 11 clones que hibridaram. A inserção de DNA dos 11 clones foi amplificada em lisados de placas fágicas por reacção em cadeia com polimerase (PCR) usando como iniciadores um primeiro oligonucleótido codificador do começo da cadeia pesada RFT5 até ao aminoácido N $^{\circ}$ 7 (sequência previamente determinada). O segundo iniciador foi projectado



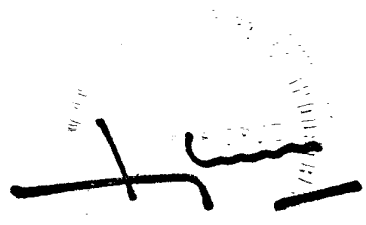
tendo em consideração a frequência de utilização de códons pelos genes. Os fragmentos de DNA obtidos a partir de cada um dos 11 clones foram analisados por transferência Southern usando como sonda um oligonucleótido codificador da sequência de aminoácidos entre os aminoácidos 20 e 27 da cadeia pesada RFT5 que foi também projectada de acordo com a utilização de códons mais frequente. Usando a sonda foram detectados 9 clones fágicos idênticos. Parte da inserção de DNA que codifica o domínio variável foi sequenciada pelo método de terminação didesoxi e pode-se ver em Seq. Id. N°1.

Exemplo 2 Construção de um gene da cadeia pesada quimérica RFT5

Um fragmento EcoRI de 6 Kb obtido por digestão do DNA de um dos 9 clones fágicos e compreende o gene do domínio variável da cadeia pesada de RFT5 (incluindo o promotor e o potenciador) foi clonado no sítio de restrição EcoRI de neo-parte constante rido vector de expressão eucariótico pSV2 (Heinrich et al, supra) como se mostra na Figura 3A. Em seguida a sequência de nucleótidos do gene codificador do domínio variável da cadeia pesada de RFT5 foi determinada para excluir a possibilidade de a mutação neste gene ter ocorrido durante a propagação do plasmídeo.

Exemplo 3 Clonagem do gene codificador do domínio variável da cadeia leve de RFT5

O DNA genómico dos hibridomas RFT5, RFT5* e RFT4 e da linha celular parental NS-1 foi isolado e digerido com EcoRI. Cada um dos DNAs digeridos foi então fraccionado no mesmo gel de agarose. Após migração, o gel de agarose foi analisado por transferência Southern usando como sonda um fragmento de DNA marcado com ^{32}P compreendendo os 5 genes J_k de murganho e o gene C_k de murganho.

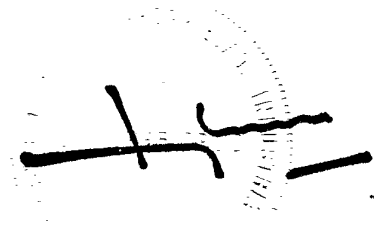


3 tipos principais de bandas de aproximadamente 12, 16 e 18 Kb foram revelados no gel após hibridação como se mostra na Figura 2B. Os fragmentos maiores são os únicos específicos do hibridoma RFT5. Os fragmentos EcoRI fraccionados pelo tamanho de aproximadamente 18 Kb foram clonados no fago EMBL4 (Stratagene), 7×10^5 clones fágicos recombinantes foram despistados com a sonda descrita atrás e encontrou-se 2 clones que hibridaram, cada um compreendendo uma inserção idêntica de 18 Kb. Mostrou-se que um subfragmento EcoRI-XbaI de 4,4 Kb contém o gene completo codificador do domínio variável da cadeia leve de RFT5 e foi clonado no plasmídeo pGEM4 (Stratagene). Determinou-se a sequência do fragmento de 4,4 Kb. Parte da inserção de DNA de 4,4 Kb que codifica o domínio variável foi sequenciada. A sequência pode-se observar na Seq. Id. N22.

Exemplo 4 Construção de um gene quimérico da cadeia leve de RFT5

Um fragmento XbaI-XbaI de 1,1 Kb codificador do potenciador da cadeia pesada murina (Heinrich et al; supra) juntamente com um fragmento HindIII-SphI codificador da parte constante K humana foi subclonado no fago mp18 (Stratagene). Após destruição dos sítios de restrição por mutagênese um fragmento com extremos EcoRI-HindIII preenchidos compreendendo a sequência do potenciador da cadeia pesada murina (E μ) e a parte constante k (huCk) foi clonado no sítio EcoRI-BamHI do pSV2-DHFR. pSV2-DHFR foi obtido por substituição do fragmento BamHI-HindIII do pSV2-neo com o fragmento BamHI-HindIII codificador do gene DHFR.

O fragmento EcoRI-XbaI de 4,4 Kb do Exemplo 3 foi então inserido em pSV2-DHFR-E μ -huCk.



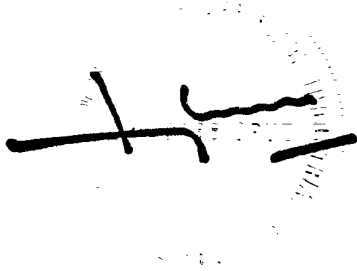
Exemplo 5 Expressão de um anticorpo quimérico RFT5

Os plasmídeos conforme obtidos nos Exemplos 2 e 4 foram cotransfectados na linha de células de mieloma de ratinho Sp2/O (ATCC CRL 1581) por electroporação usando um sistema pulsador de genes da Biorad. Sabe-se que esta técnica cria transfectantes estáveis com uma frequência elevada. A linha celular SP2/O não produz cadeias leve e pesada endógenas e é sensível à Geneticin (G 418) numa concentração de 0,8 mg/ml.

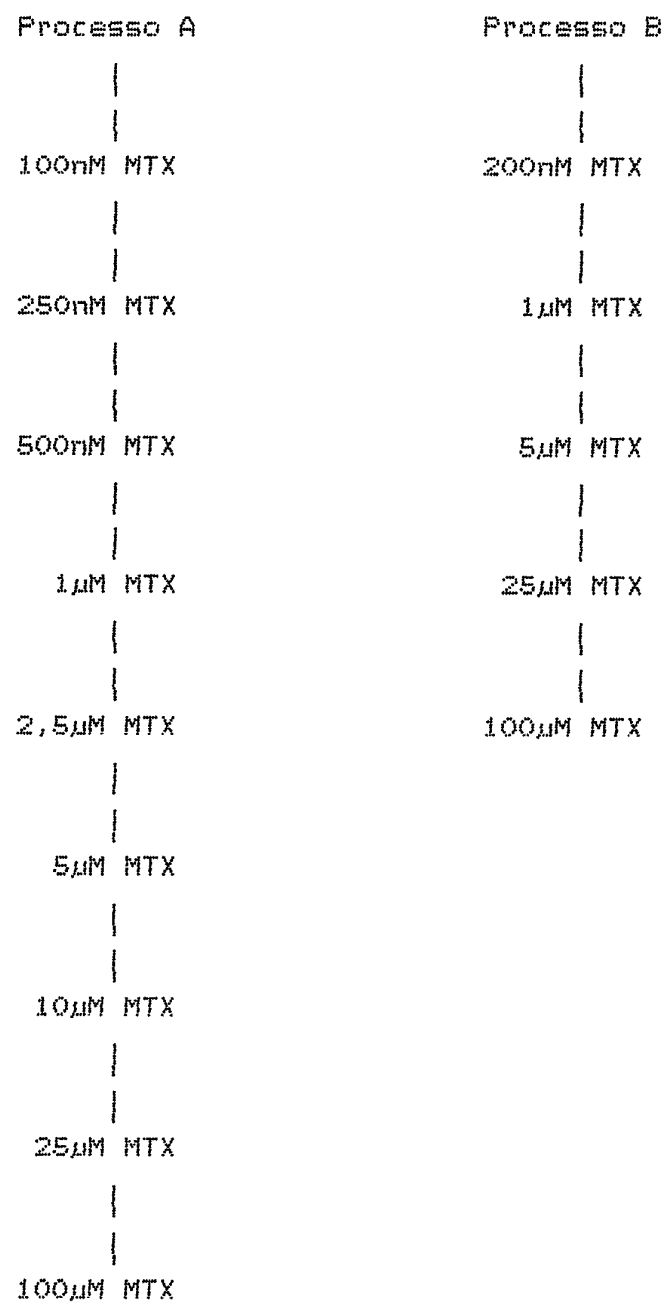
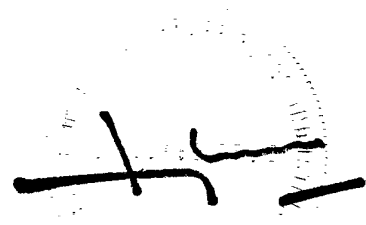
As células SP2/O foram cultivadas no meio de crescimento habitual (RPMI + 10% FCS + 5×10^{-5} β -mercaptoetanol), colhidas na fase log do crescimento e lavadas com o tampão de electroporação (Bio-Rad). A concentração celular foi ajustada a 2×10^7 células/ml. A 0,8 ml da suspensão celular foi adicionado 15-20 μ g de cada plasmídeo. A mistura foi colocada em gelo e deixada em repouso durante 10 min. Em seguida as células foram sujeitas a um pulso eléctrico (280 Volt; 25 μ F) e novamente deixado em repouso durante 15 min. As células foram transferidas para o meio de crescimento habitual e incubadas a 37°C numa estufa de CO₂.

Após 3 dias de incubação, começou a selecção da resistência à G418. As células foram ressuspensas em meio fresco contendo 1,4 mg/ml de G418. As culturas deram células em crescimento após 10-14 dias de incubação na presença de G418. Após 2 semanas de incubação, os sobrenadantes das culturas confluentes foram testados relativamente à expressão de IgG humana numa ELISA tipo sanduíche (anti-cadeia leve k humana / sobrenadante / conjugado anti-IgG humana-fosfatase alcalina).

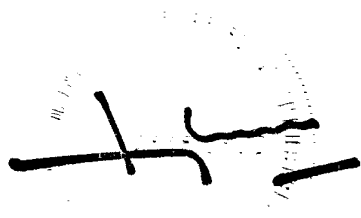
Este teste indica que as moléculas de anticorpo completas são secretadas em todas as culturas em concentrações variáveis na gama de 50-500 ng/ml.



Para seleccionar células em que o gene DHFR foi amplificado e portanto secreta grandes quantidades do anticorpo pretendido realizaram-se dois processos de selecção para resistência ao metotrexato (MTX) como se descreve abaixo. Com esta finalidade, os conjuntos de células resistentes a G418 foram divididos e a amplificação prosseguiu de acordo com o processo A (MTX aumenta por um factor de 2 ou 2,5) ou processo B (MTX aumenta por um factor de 5).



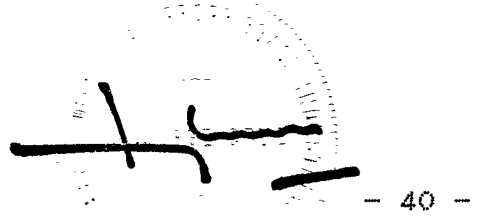
Cada passo de amplificação compreende a inoculação de células a uma densidade de 2×10^5 células/ml no meio de crescimento habitual suplementado com G 418 a 1,4 mg/ml e com MTX numa



concentração escolhida. Após 72 horas de incubação, as células e o sobrenadante foram separadas. A secreção de anticorpos foi controlada por ELISA ou por HPLC usando uma coluna de proteína A.

As Figuras 4A e 4B mostram a produtividade de anticorpos do mesmo conjunto de transfectantes. A maior parte dos conjuntos atinge um máximo de produção de anticorpos específicos numa certa concentração de metotrexato. Os melhores conjuntos de produtores foram clonados por diluição limite. De entre centenas de clones analisados seleccionaram-se os 15 melhores clones produtores. A produtividade dos clones variou entre 30 e 50 mg de MAb/10⁹ células em 72 horas.

O anticorpo foi purificado a partir de um sobrenadante de cultura por eluição numa coluna de afinidade de proteína A.



IDENTIFICADOR DE SEQUÊNCIAS Nº1

Matéria em causa: Domínio variável da cadeia pesada de imunoglobulina do anticorpo RFT5

Tipo de sequência: Sequência de nucleótidos e correspondente sequência de aminoácidos

Tipo de molécula: DNA genómico

Comprimento: 492 nucleótidos

Fonte original: Um hibridoma murino

Características da sequência de nucleótidos:

Um intrão está situado entre o nucleótido 47 e 130

Gene do segmento V: do nucleótido 142 ao 435

Gene do segmento D: do nucleótido 436 ao 447

Gene do segmento J: do nucleótido 448 ao 492

Características da sequência de aminoácidos:

Peptídeo líder: desde o aminoácido (a.a.) -19 até -1

FR1: desde a.a. 1 até 30

CDR1: desde a.a. 31 até 35

FR2: desde a.a. 36 até 49

CDR3: desde a.a. 50 até 66

FR3: desde a.a. 67 até 98

CDR3: desde a.a. 107 até 117.

~~Handwritten scribble~~

ATG GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCG GTA ATT TCA G 46
Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser
-15 -10 -5

GTAAGGGGCT CACCAGTTCC ATATCTGAAA GAGGATACAG GGTCTGAAGT GACAATGACA 106

TCTACTCTGC TGTTCTCTCC ACAG GG GTC TAC TCA GAG GTT CAG CTC CAG 156
Gly Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln
-1 1 5

CAG TCT GGG ACT GTG CTG GCT AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG ATG TCC 204
Gln Ser Glu Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
10 15 20

TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGC TTT ACC AGG TAC TGG ATG CAC TGG ATA 252
Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met His Trp Ile
25 30 35

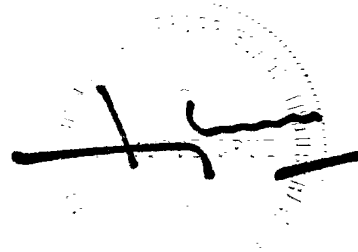
AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GCT ATT TAT CCT 300
Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro
40 45 50

GGA AAT AGT GAT ACT AGT TAC AAC CAG AAG TTC GAG GGC AAG GCC AAA 348
Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Lys Ala Lys
55 60 65

CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC AGC ACT GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC 396
Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
70 75 80 85

CTG ACA CAT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT TCA AGA GAC TAC GGC 444
Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Tyr Gly
90 95 100

TAC TAC TTT GAC TTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 492
Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
105 110 115



IDENTIFICADOR DE SEQUÊNCIAS Nº2

Matéria em causa: Domínio variável da cadeia leve de
imunoglobulina do anticorpo RFT5

Tipo de sequência: Sequência de nucleótidos e correspondente
sequência de aminoácidos

Tipo de molécula: DNA genômico

Comprimento: 455 nucleótidos

Fonte original: Um hibridoma murino

Características da sequência de nucleótidos:

Um intrão está situado entre o nucleótido 50
e 225

Gene do segmento V: do nucleótido 244 ao 519

Gene do segmento J₂: do nucleótido 520 ao 455

Características da sequência de aminoácidos:

Peptídeo líder: desde o aminoácido (a.a.) -22 até -1

FR1': desde a.a. 1 até 23

CDR1': desde a.a. 24 até 33

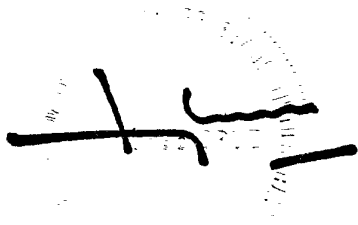
FR2': desde a.a. 34 até 48

CDR3': desde a.a. 49 até 55

FR3': desde a.a. 56 até 87

CDR3': desde a.a. 88 até 94

FR4': desde a.a. 95 até 104



ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA G 49
 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 -20 -15 -10

GTAACAGAGG GCAGGGAATT TGAGATCAGA ATCCAACCAA AATTATTTTC CCTGGGGAAT 109
 TTGAGTCTAA AATACAGTTT TTTTTCTTTT TTCTTCATCT GAATGTGGG TGGTATAAAA 169
 TTATTTTTGT TTCTCTATTT CTAATAATCC CTTTCTCTCT ATTTTGCTTT TTTCTAG 226
 TC ATA CTG TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC 273
 Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 -5 -1 1 5 10

ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC 321
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 15 20 25

TCA AGT ATA AGT TAC ATG CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC 369
 Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
 30 35 40

CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT 417
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 45 50 55

GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC 465
 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 60 65 70

AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG CGG 513
 Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg
 75 80 85 90

AGT AGT TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAA CTG GAA ATA AAA 555
 Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 95 100

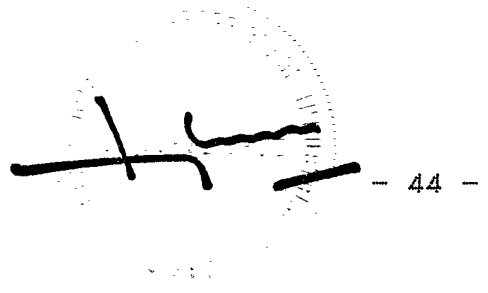


Tabela 1

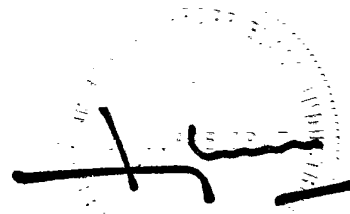
Região	Localizações na cadeia pesada	Localizações na cadeia leve
FR1	aminoácidos 1 a 30 (com um resíduo ocasional em O)	aminoácidos 1 a 23 (com um resíduo ocasional em O e uma deleção em 10 nas cadeias λ)
CDR1	aminoácidos 31 a 35 (com possíveis inserções numeradas com 35A, 35B)	aminoácidos 24 a 34 (com possível inserção numerada com 27A, B, C, D, e F)
FR2	aminoácido 36 e 49	aminoácido 35 a 49
CDR2	aminoácido 50 a 65 (com possíveis inserções numeradas como 52A B e C)	aminoácido 50 a 56
FR3	aminoácido 66 a 94 (com	aminoácido 57 a 88
CDR3	aminoácido 95 a 102 (com possíveis inserções numeradas como 100A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, e K)	aminoácido 89 a 97 com possíveis inserções numeradas como 95A, B, C, D, E e F)
FR4	aminoácido 103 a 113	aminoácido 98-107 (com uma possível inserção numerada com 106A)

REIVINDICAÇÕES

1a. - Processo para a produção de uma molécula de ligação a CD25 que compreende pelo menos um sítio de ligação ao antigénio compreendendo pelo menos um domínio que engloba na sequência, as regiões hipervariáveis DCDR1, CDR2 e CDR3; tendo a referida CDR1 a sequência de aminoácidos Arg-Tir-Trp-Met-His, tendo a referida CDR2 a sequência de aminoácidos Ala-Ile-Tir-Pro-Gli-Asn-Tre-Ser-Tir-Asn-Gln-Lis-Fen-Glu-Gli, e tendo a referida CDR3 a sequência de aminoácidos Asp-Tir-Gli-Tir-Tir-Fen-Asp-Fen; ou seus equivalentes directos; caracterizado por compreender o passo de cultura de uma linha celular de hibridoma ou de um organismo transformado com uma construção de DNA compreendendo sequências de nucleótidos codificando sequenciadamente as referidas regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3, e isolamento de uma molécula de ligação a CD25 a partir da cultura.

2a. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a molécula de ligação a CD25 compreender pelo menos um sítio de ligação ao antigénio compreendendo:

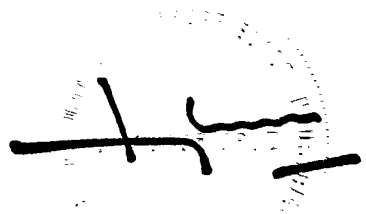
- a) um primeiro domínio compreendendo sequenciadamente as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3; tendo a referida CDR1 a sequência de aminoácidos Arg-Tir-Trp-Met-His, tendo a referida CDR2 a sequência de aminoácidos Ala-Ile-Tir-Pro-Gli-Asn-Ser-Asp-Tre-Ser-Tir-Asn-Gln-Lis-Fen-Glu-Gli e tendo a referida CDR3 a sequência de aminoácidos Asp-Tir-Gli-Tir-Tir-Fen-Asp-Fen e
- b) um segundo domínio compreendendo sequenciadamente as regiões hipervariáveis CDR1', CDR2' e CDR3', tendo a referida CDR1' a sequência de aminoácidos Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tir-Met-Gln, tendo a referida CDR2' a sequência de aminoácidos



Asp-Tre-Ser-Lis-Leu-Ala-Ser e tendo a referida CDR3' a sequência de aminoácidos His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tir-Tre;

ou seus equivalentes directos.

38. - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a molécula de ligação a CD25 compreender pelo menos um sítio de ligação ao antigénio compreendendo um domínio tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à mostrada em Seq. Id. N.º 1;



ATG GAA TGT AAC TGG ATA CTT CCT TTT ATT CTG TCG GTA ATT TCA G 46
 Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ile Ser
 -15 -10 -5

GTAAGGGGCT CACCAGTCC ATATCTGAAA GAGGATACAG GGTCTGAAGT GACAATGACA 106

TCTACTCTGC TGTCTCTCC ACAG GG GTC TAC TCA GAG GTT CAG CTC CAG 156
 Gly Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln
 -1 1 5

CAG TCT GGG ACT GTG CTG GCT AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG ATG TCC 204
 Gln Ser Glu Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
 10 15 20

TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGC TTT ACC AGG TAC TGG ATG CAC TGG ATA 252
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met His Trp Ile
 25 30 35

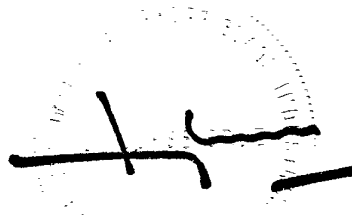
AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GCT ATT TAT CCT 300
 Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro
 40 45 50

GGA AAT AGT GAT ACT AGT TAC AAC CAG AAG TTC GAG GGC AAG GCC AAA 348
 Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly Lys Ala Lys
 55 60 65

CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC AGC ACT GCC TAC ATG GAG CTC AGC AGC 396
 Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 70 75 80 85

CTG ACA CAT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT TCA AGA GAC TAC GGC 444
 Leu Thr His Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Asp Tyr Gly
 90 95 100

TAC TAC TTT GAC TTC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA 492
 Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 105 110 115



- 48 -

começando com o aminoácido na posição 1 e terminando com o aminoácido na posição 117 ou compreendendo um primeiro domínio como descrito atrás e um segundo domínio tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à mostrada na Seq. Id. Nº 2:

~~SECRET~~
- 49 -

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCC TCA G 49
Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
-20 -15 -10

GTAACAGAGG GCAGGGAATT TGAGATCAGA ATCCAACCAA AATTATTTTC CCTGGGGAAT 109

TTGAGTCTAA AATACAGTTT TTTTTCITTT TTCTTCATCT GAATGTGGG TGGTATAAAA 169

TTATTTTTGT TTCICTATTT CTACTAATCC CTTTCTCTCT ATTTTGCTTT TTTCTAG 226

TC ATA CTG TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT CCA GCA ATC 273
Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
-5 -1 1 5 10

ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC ATG ACC TGC AGT GCC AGC 321
Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
15 20 25

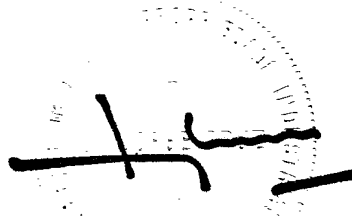
TCA AGT ATA AGT TAC ATG CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC ACC TCC 369
Ser Ser Ile Ser Tyr Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
30 35 40

CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT 417
Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
45 50 55

GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAT TCT CTC ACA ATC 465
Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
60 65 70

AGC AGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAT CAG CGG 513
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg
75 80 85 90

AGT AGT TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAA CTG GAA ATA AAA 555
Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
95 100



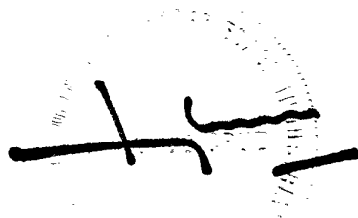
começando com o aminoácido na posição e terminando com o aminoácido 104.

4a. - Processo de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado por a molécula de ligação a CD25 compreender pelo menos

- a) uma cadeia pesada de imunoglobulina ou seu fragmento que compreende (i) um domínio variável compreendendo na sequência as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3 e (ii) a parte constante ou seu fragmento de uma cadeia pesada humana; tendo a referida CDR1 a sequência de aminoácidos Arg-Tir-Trp-Met-His, tendo a referida CDR2 a sequência Ala-Ile-Tir-Pro-Gli-Asn-Ser-Tir-Asn-Gln-Lis-Fen-Glu-Gli e tendo a referida CDR3 a sequência de aminoácidos Asp-Tir-Gli-Tir-Tir-Fen-Asp-Fen e
- b) uma cadeia leve de imunoglobulina ou seu fragmento que compreende (i) um domínio variável compreendendo sequenciadamente as regiões hipervariáveis CDR1', CDR2' e CDR3' e (ii) a parte constante ou um seu fragmento de uma cadeia leve humana; tendo a referida CDR1' a sequência de aminoácidos Ser-Ala-Ser-Ser-Ser-Ile-Ser-Tir-Met-Gln, tendo a referida CDR2' a sequência de aminoácidos Asp-Tre-Ser-Lis-Leu-Ala-Ser, e tendo a referida CDR3' a sequência de aminoácidos His-Gln-Arg-Ser-Ser-Tir-Tre;

ou seus equivalentes directos.

5a. - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por a molécula de ligação a CD25 compreender pelo menos



- a) uma cadeia pesada que compreende um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntica à mostrada na Seq. Id. N^o 1 começando com o aminoácido na posição 1 e terminando com o aminoácido na posição 117 e a parte constante de uma cadeia pesada humana; e
- b) uma cadeia leve que compreende um domínio variável tendo uma sequência de aminoácidos substancialmente idêntico à mostrada na Seq. Id. N^o 2 começando com ácido glutâmico na posição 1 e terminando com ácido glutâmico na posição 104 e a parte constante de uma cadeia leve humana.

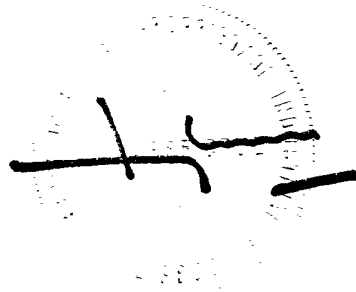
6^a. - Processo de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado por, na molécula de ligação a CD25, a parte constante ou seu fragmento da cadeia pesada humana ser do tipo γ_1 e a parte constante ou seu fragmento da cadeia leve humana ser do tipo κ .

7^a. - Processo para a produção de uma molécula de ligação a CD25 de multi-cadeias, caracterizado por compreender:

A) a cultura de um organismo que é transformado com

i) uma construção de DNA correcta que codifica uma cadeia pesada ou seu fragmento e compreende

a) uma primeira parte que codifica um domínio variável compreendendo alternativamente regiões estruturais e hipervariáveis, sendo as referidas regiões hipervariáveis sequencialmente CDR1, CDR2 e CDR3, cujas sequências de aminoácidos estão apresentadas em Seq. Id. N^o 1; começando esta primeira parte com um códon codificador do primeiro aminoácido do domínio



variável e terminando com um codão codificador do último aminoácido do domínio variável e

b) uma segunda parte que codifica uma parte constante da cadeia pesada ou um seu fragmento que começa com um codão codificador do primeiro aminoácido da parte constante da cadeia pesada e termina com um codão codificador do último aminoácido da parte constante ou seu fragmento, seguido de um codão sem sentido;

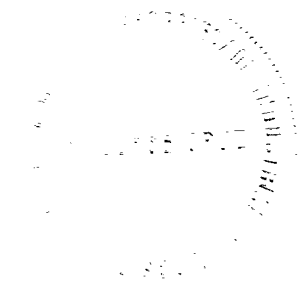
e com

ii) uma construção de DNA que codifica uma cadeia leve ou seu fragmento e compreende

a) uma primeira parte que codifica um domínio variável compreendendo alternativamente regiões estruturais e hipervariáveis; sendo as referidas regiões hipervariáveis sequencialmente CDR1', CDR2' e CDR3', cujas sequências de aminoácidos estão apresentadas em Seq. Id. N.º 2; começando esta primeira parte com um codão codificador do primeiro aminoácido do domínio variável e terminando com um codão codificador do último aminoácido do domínio variável e

b) uma segunda parte que codifica uma parte constante da cadeia leve ou seu fragmento que começa com um codão codificador do primeiro aminoácido da parte constante da cadeia leve e termina com um codão codificador do último aminoácido da parte constante ou seu fragmento seguido de um codão sem sentido;

e B) a recuperação de uma molécula activa de ligação a CD25 a partir da cultura.



88. - Processo para a preparação de uma composição imuno-supressora, caracterizado por compreender o passo de mistura de pelo menos uma molécula de ligação a CD25 e pelo menos uma molécula de ligação ao antigénio contra pelo menos um anti-génio diferente de CD25 que seja característico de células T activadas.

98. - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por compreender ainda a mistura de ciclosporina A.

108. - Processo de acordo com a reivindicação 8 ou reivindicação 9, caracterizado por a molécula de ligação a CD25 ser o anticorpo quimérico CD25 do Exemplo 5 e a outra molécula de ligação ao antigénio ser um anticorpo quimérico CD7.

Lisboa, 14 de Março de 1991

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

Fig. 1A

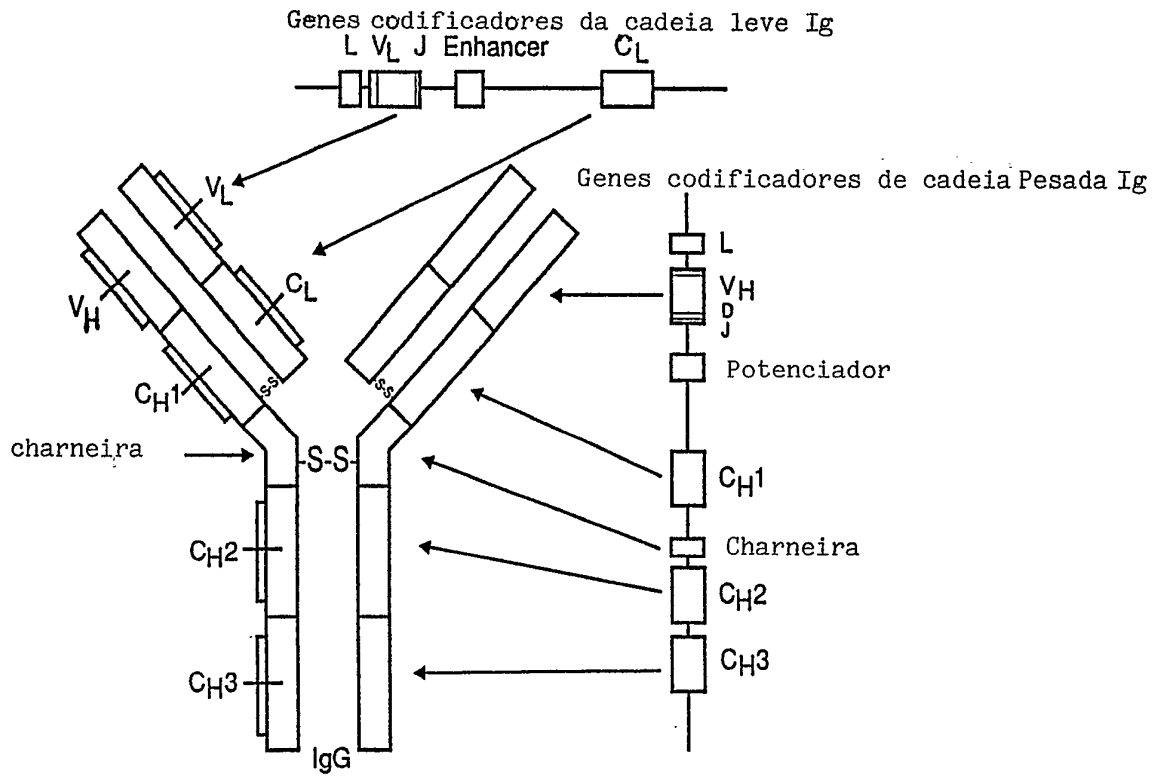


Fig. 1B



Fig. 2A

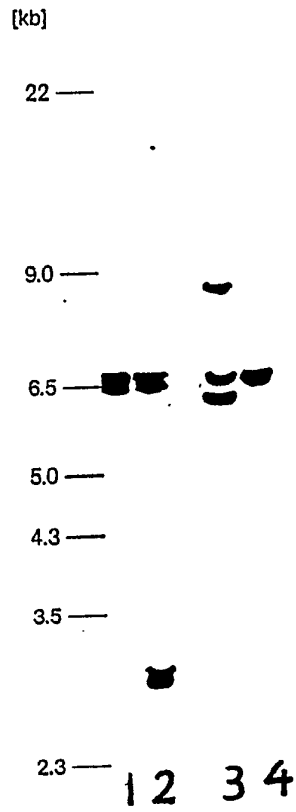


Fig. 2B

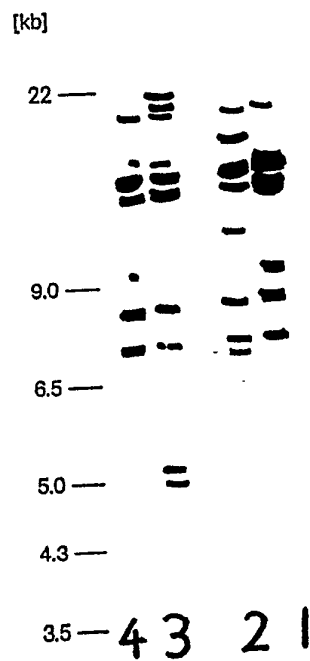


Fig. 3A

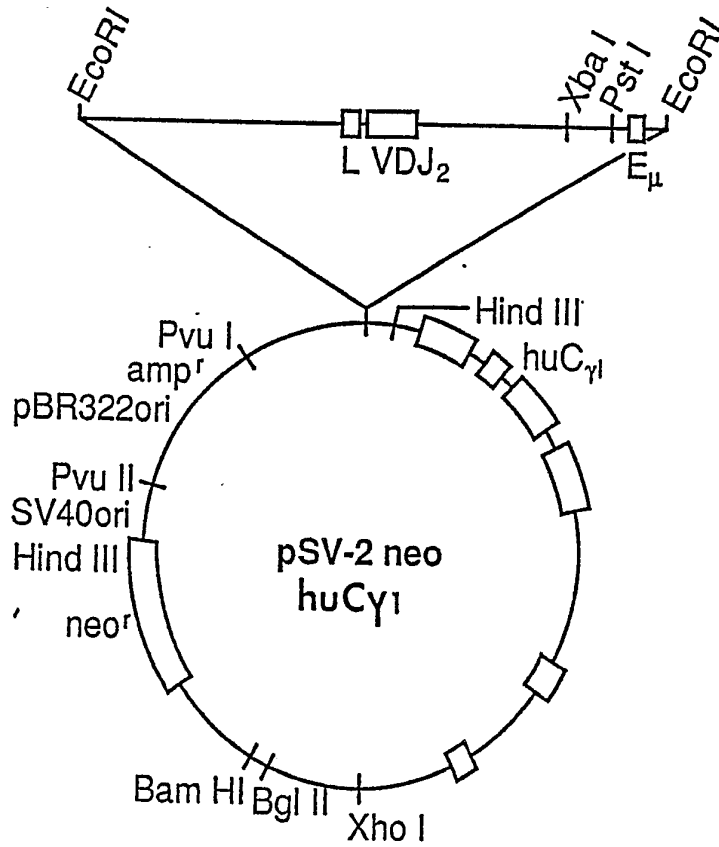
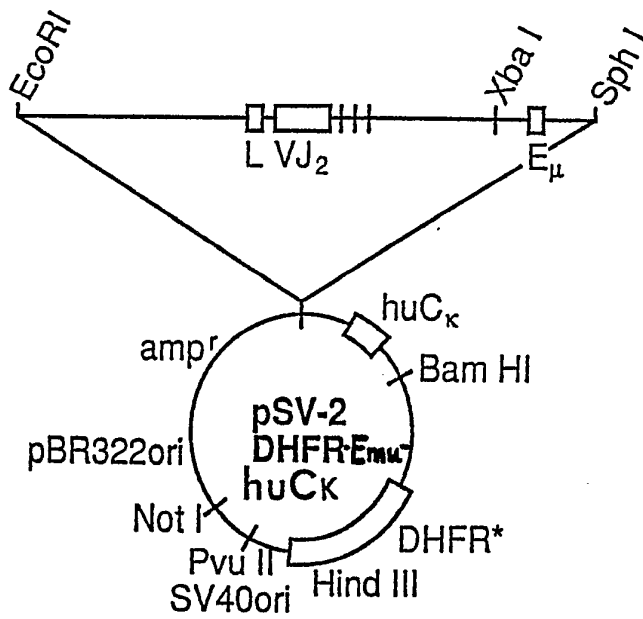
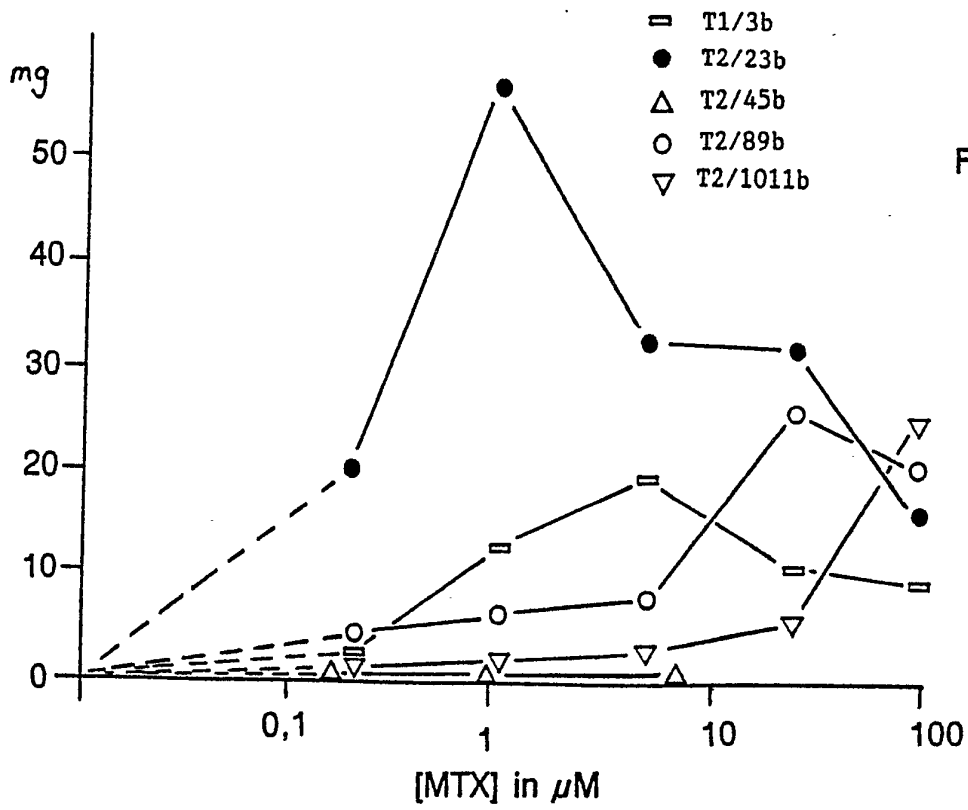
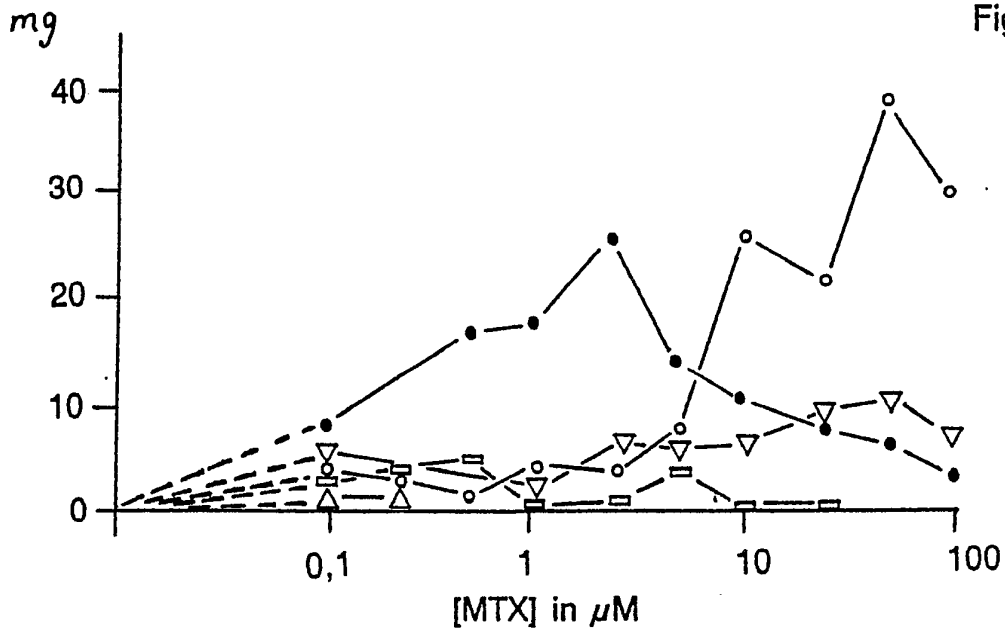


Fig. 3B



- T1/3a
- T2/23a
- △ T2/45a
- T2/89a
- ▽ T2/1011a



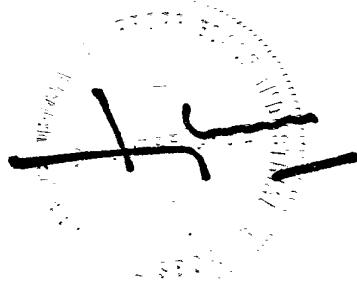


Figure 5

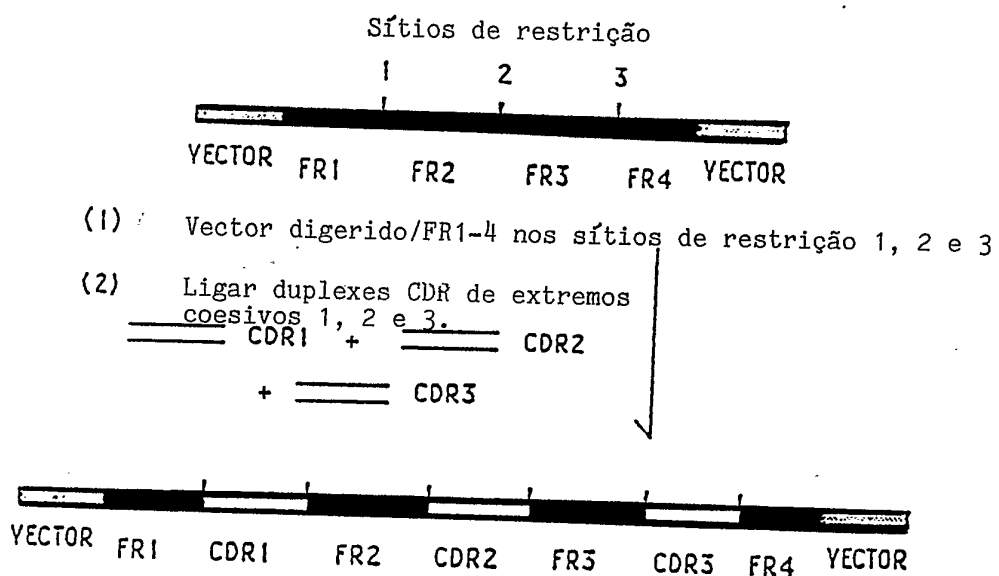


Fig. 6

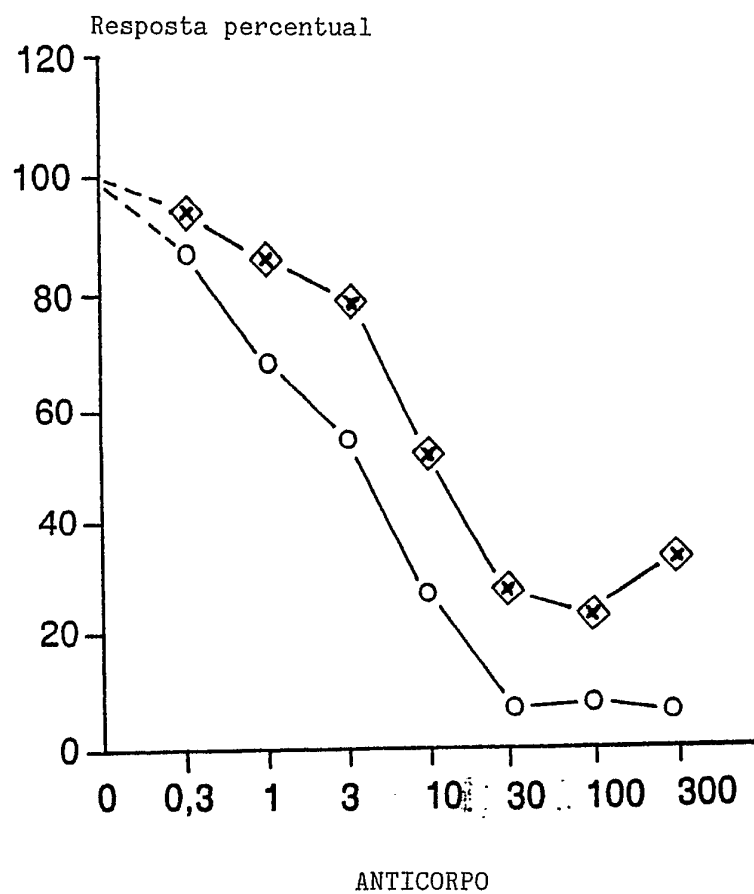
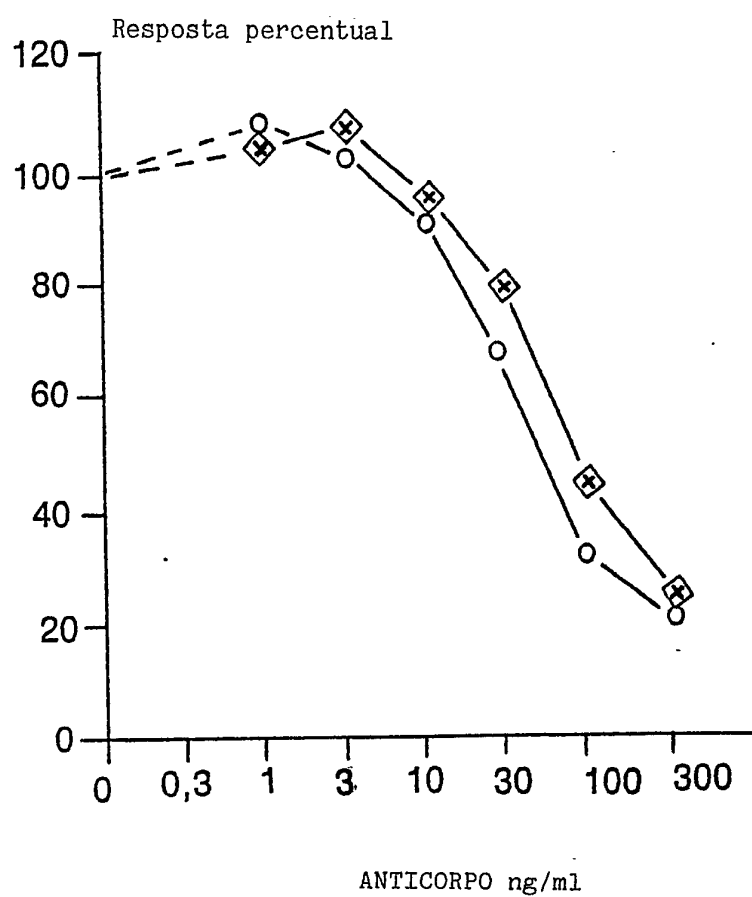


Fig. 7



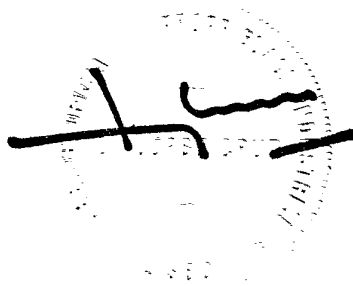
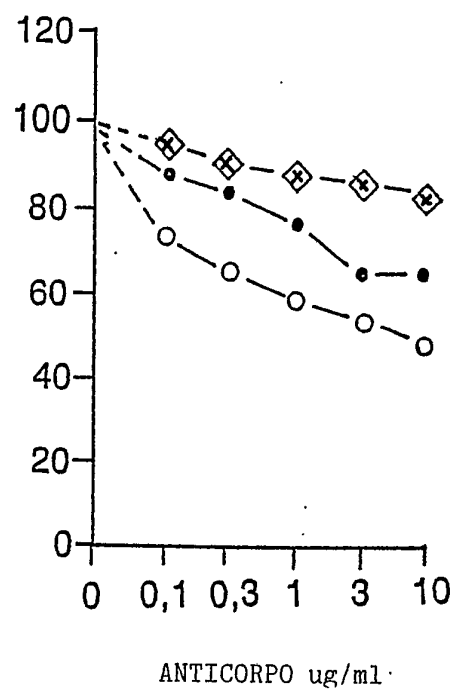
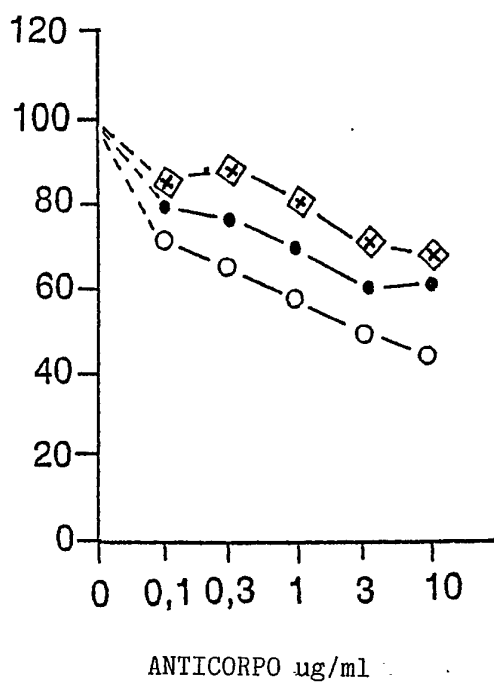


Fig. 8 A

Fig. 8 B

RESPOSTA PERCENTUAL



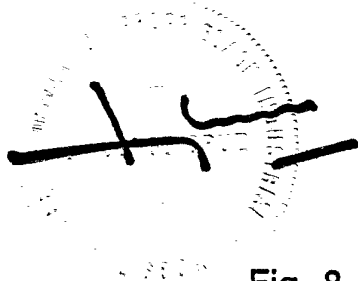


Fig. 8 C

Fig. 8 D

RESPOSTA PERCENTUAL

