



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 90195 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 5)

A61K039/395 A

A61K039/42 B

A61K039/39 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1989.04.04

(30) *Prioridade:* 1988.04.04 US 176825
1988.11.14 US 271934

(43) *Data de publicação do pedido:*
1989.11.10

(45) *Data e BPI da concessão:*
12/93 1993.12.06

(73) *Titular(es):*

ONCOGEN
3005 FIRST AVENUE, SEATTLE WASHINGTON
98121 US

(72) *Inventor(es):*

JEFFREY A. LADBETTER US

(74) *Mandatário(s):*

ANTÓNIO LUIS LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DE MIGUEL LUPI 16 R/C 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HETERO CONJUGADOS DE ANTICORPOS PARA UTILIZAÇÃO NA REGULAÇÃO DA ACTIVIDADE LINFOCITICA

(57) *Resumo:*

[Fig.]

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 90 195

REQUERENTE: ONCOGEN, norte-americana, industrial, com sede em 3005 First Avenue, Seattle, Washington 98121, Estados Unidos da América.

EPÍGRAFE: " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE HETEROCONJUGADOS DE ANTICORPOS PARA UTILIZAÇÃO NA REGULAÇÃO DA ACTIVIDADE LINFICÍTICA "

INVENTORES: Jeffrey A. Ladbetter.

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

Estados Unidos da América, em 04 de Abril de 1988, sob o n.º. 176,825 e em 14 de Novembro de 1988, sob o n.º. 271,934.

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 90.195

REQUERENTE: ONCOGEN, norte-americana, com sede em 3005
First Avenue, Seattle, Washington 98121,
Estados Unidos da América

EPIGRAFE: "Heteroconjugados de anticorpos para utiliza-
ção na regulação da actividade linfocítica"

INVENTORES: Jeffrey A. Ledbetter,

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

U.S.A., 04 de Abril de 1988, sob o Nº 176,825

U.S.A., 14 de Novembro de 1988, sob o Nº 271,934

4

ONCOGEN

"HETEROCONJUGADOS DE ANTICORPOS PARA UTILIZAÇÃO NA
REGULAÇÃO DA ACTIVIDADE LINFOCÍTICA"

ÂMBITO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a novos heteroconjugados de anticorpos com anticorpos bi-específicos e à sua utilização na regulação da actividade dos linfócitos tais como as células T e as células B. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a heteroconjugados que compreendam pelo menos dois anticorpos acoplados um ao outro, reactivo, cada um dos anticorpos, com um antigénio diferente da superfície dos linfócitos. Estes heteroconjugados parecem actuar ligando-se aos linfócitos e trazendo os respectivos antigénios da superfície celular com os quais reagem para uma proximidade física um do outro, de que resulta um aumento ou uma redução na transdução de sinal e na proliferação dos linfócitos. De acordo com um aspecto preferido da presente invenção, procede-se à ligação cruzada de um anticorpo-reactivo com o receptor da célula T ou com o seu complexo CD3 associado, com um segundo antigénio da superfície da célula T, tal como CD2, CD4, CD6 ou CD8 para aumentar a activação e funcionamento das células T. De acordo com outro aspecto preferido, procede-se à ligação cruzada de um anticorpo

reactivo com o antigénio da superfície da célula T, CD5, com um anticorpo que reage com um segundo antigénio da superfície da célula T, tal como CD4, CD6 ou CD8, para intensificar a activação e funcionamento dos linfócitos. Num aspecto preferido adicional, procede-se à ligação cruzada de um anticorpo reactivo com os antigénios da família CD45, com um anticorpo reactivo com um segundo antigénio na superfície das células T, tal como CD2, CD3, CD5 ou CD28, para inibir a activação e funcionamento dos linfócitos. Ainda num outro aspecto preferido, procede-se à ligação cruzada de um anticorpo reactivo com o antigénio CD4, com um anticorpo reactivo com o antigénio CD45 para intensificar a activação e funcionamento dos linfócitos. A presente invenção também se refere a novos anticorpos bi-específicos, de preferência anticorpos monoclonais bi-específicos que comportam uma primeira região reactiva de ligação com um antigénio de um linfócito e uma segunda região reactiva de ligação com um segundo antigénio linfocítico. Em um aspecto preferido, preparou-se um anticorpo monoclonal bi-específico contendo uma primeira região reactiva que se liga com o antigénio CD3 e uma segunda região reactiva de ligação com um segundo antigénio de linfócitos, tal como CD2, CD4, CD6 ou CD8, para reforçar a activação e a função de células T. De acordo com um outro aspecto preferido, um anticorpo monoclonal bi-específico contém uma primeira região reactiva de ligação com um antigénio CD5 e uma segunda região reactiva de ligação com um segundo antigénio de linfócitos, tal como CD4, CD6 ou CD8 para reforçar a activação e a função linfocitárias. Em um aspecto adicional preferido, um anticorpo mono-

clonal bi-específico contém uma primeira região reactiva de ligação com a família de antigénios CD45 e uma segunda região reactiva de ligação com um segundo antigénio de superfície de linfócitos tal como CD2, CD3, CD5 ou CD28 para inibir a activação e a função linfocitárias. Os heteroconjugados de anticorpos bi-específicos, os métodos e composições da presente invenção, são úteis na regulação dos linfócitos para proporcionar reacções imunológicas melhoradas das células, no tratamento de doenças tais como doenças infecciosas, carcinomas, SIDA e doenças de auto-imunidade.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Sabe-se que os linfócitos T, também referidos na especialidade por células T, funcionam como mediadores de respostas imunológicas, pelo menos, por duas vias distintas. As células citotóxicas T encontram-se envolvidas na lise de células alvo específicas, enquanto as células auxiliares T prestam assistência na proliferação e diferenciação das células B, levando à produção de anticorpos específicos para antigénios. (Ver, por exemplo, J.W. Kimball (ed.), Introduction To Immunology, 2ª edição, Capítulos 11-13, Macmillan Publishing Co. (1986)). Qualquer dos tipos de célula T é activado para efectuar a sua função, por intermédio da interacção do receptor da célula T (Ti) ou do complexo CD3 associado (também referido como o complexo receptor CD3/Ti) na superfície da célula T com o antigénio ou com uma célula que apresente um antigénio [ver, por exemplo, Reinherz et

al., "Clonotypic Surface Structure On Human Lymphocytes: Funcional and Biochemical Analysis of The Antigen Receptor Complex", Immunol. Rev., 81:95-129 (1984) 7.

No entanto, descobriu-se que as células T, respondem a um antigénio, apenas quando esse antigénio se encontra associado com um antigénio codificado por MHC (complexo de histo-compatibilidade principal) na célula que apresenta o antigénio. No entanto, diz-se que o reconhecimento de um antigénio pelas células T se limita à classe dos produtos codificados por MHC associados com o antigénio. O resultado desta limitação MHC reside no facto das células T citotóxicas serem activadas pelos antigénios em associação com os antigénios MHC da classe I e das células T auxiliares serem activadas pelos antigénios associados com os antigénios MHC da classe II (ver, por exemplo, Kimball (ed.). Introduction To Immunology, supra, págs. 286-89 e págs. 348-58).

Para além disto, reconhece-se que as células T limitadas por MHC da classe II, expressam, para além do complexo receptor CD3/Ti, um antigénio da superfície celular denominado CD4, enquanto as células T limitadas por MHC da classe I expressam um antigénio da superfície celular denominado CD8. Esta associação entre a restrição de MHC e a expressão do antigénio CD conduziu à hipótese de que, na activação das células T, os respectivos antigénios MHC são ligandos naturais dos antigénios CD, isto é, o antigénio CD4 nas células auxiliares T interactua

com as moléculas MHC da classe II nas células que apresentam o antigénio (por exemplo, macrófagos) e que o antigénio CD8 nas células T citotóxicas interacciona com as moléculas MHC da classe I em células alvo específicas (por exemplo, células infectadas por vírus) [ver, por exemplo, Emrich et al., "Cross-Linking Of The T Cell Receptor Complex With The Subset-Specific Differentiation Antigen Stimulates Interleukin 2 Receptor Expression In Human CD4 And CD8 T Cells", Eur. J. Immunol., 17:529-34 (1987)]. Para além disso, também se pôs a hipótese de que o reconhecimento do antigénio pelas células T pudesse ocorrer por intermédio de um complexo quaternário em que o complexo receptor CD3/Ti na superfície da célula T, em associação com um antigénio CD tal como CD4 ou CD8 "visse" o antigénio, em associação com o antigénio adequado que codifica MHC [ver, por exemplo, Anderson et al., "Cross-Linking of T3 (CD3) With T4 (CD4) Enhances The Proliferation Of Resting T Lymphocytes", J. Immunol., 139 (Nº 3):678-82 (1987)].

De acordo com este pedido de patente de invenção, os antigénios CD são antigénios de diferenciação da superfície celular, naturais, definidos pela reactividade dos anticorpos monoclonais (mAbs) na superfície das células, de acordo com o designado por um "International Workshop" cuja função é proporcionar uma nomenclatura unificada para estes antigénios (ver, por exemplo, McMichael (ed.), Leukocyte Typing III, Oxford U.K., Oxford University Press, 1987). Efectuou-se a clonagem molecular de um grande número de antigénios CD e caracterizaram-

-se completamente (Id.). Os antigénios CD bem conhecidos incluem os antigénios para todas as células T, CD3, CD2, CD5, CD6 e CD7, um antigénio CD específico para o sub-grupo das células auxiliares T, CD4 e um antigénio CD específico para o sub-grupo das células T supressoras, CD8 (ver, por exemplo, Ledbetter et al., Perspectives In Immunogenetics And Histocompatibility, Vol. 6, E. Heise (ed.), Lymfocyte Surface Antigens, pp. 325-40 1984, American Society For Histocompatibility And Immunogenetics (New York 1984). O antigénio CD28 encontra-se na maioria das células T (Yamada et al., Eur. J. Immunol. 15:1164-1169 (1985)). Apesar de se pensar que estes antigénios de diferenciação funcionam como receptores, conforme se descreveu antes, e que foram ligados para transdução de sinal nas células T, desconhece-se a sua função exacta na activação das células T, e constitui o objecto de uma pesquisa intensiva.

Têm-se efectuado estudos para determinar, por exemplo, o papel desempenhado pelos antigénios na activação das células T, ao nível molecular. Sabe-se que a reacção do complexo receptor CD3/Ti com mAb ou com antigénios conduz à formação do "sinal" de transmembrana no interior da célula T. Este sinal é muitas vezes caracterizado pela formação mono-, bi- e tri-fosfatos de inositol e a um aumento na concentração do cálcio citoplásmico livre $[Ca^{2+}]_i$ [ver, por exemplo, J.B. Imboden et al., "Transmembrane Signal Ling By The T Cell Antigen Receptor", J. Exp. Med., 161:446-56 (1985) e Imboden et al., "Antigen Recognition By A Human T Cell Clone Leads To Increases In

Inositol Triphosphate", J. Immunol. 103 (nº 5): 1322-24 (1987) 7.

Contudo, a criação deste sinal pode não ser suficiente, para estimular a proliferação de células T (Id. a 873). Sob condições experimentais, quando se processa à ligação cruzada de o antigénio CD3 da superfície da célula T, por exemplo, fazendo reagir a célula com um anticorpo de ligação cruzada, que foi submetido a ligação cruzada, na presença de células acessórias (por exemplo, por interacção do receptor Fc do monócito com a porção Fc de um anticorpo para CD3) ou por imobilização do anticorpo num suporte sólido, ocorre a proliferação das células T.

Assim, os mabs para o complexo receptor CD3/Ti que se acoplaram a um suporte sólido estimulam a proliferação das células T a ver, por exemplo, Anderson et al., supra e Walker et al., "Activation Of T Cells By Cross-Linking An Anti-CD3 Antibody With A Second Anti-T Cell Antibody: Mechanism And Subset-Specific Activation", Eur J. Immunol, 17:873-80 (1987) 7, em parte devido à ligação cruzada do antigénio CD3, e em parte devido ao impedimento de internalização do complexo receptor CD3/Ti cuja internalização tende a inibir a activação das células T (ver, por exemplo, Ledbetter et al., "Valency of CD3 Binding And Internalization of The CD3 Cell-Surface Complex Control T Cell Responses To Second Signals", J. Immunol. 136:3945-52 (1986)). No entanto, existem dificuldades substan-

ciais na utilização de um anti-CD3 imobilizado num suporte sólido para aumentar a activação das células T, in vivo, para aplicação terapêutica. Uma tal utilização envolveria injeções do suporte sólido, usualmente, pequenas gotas, num doente, o que acarretaria determinados riscos para a saúde deste, tais como bloqueios ou obstruções arteriais.

Para além disso, formulou-se a hipótese de que sob condições fisiológicas, mesmo a estimulação de CD3/Ti, por intermédio da ligação cruzada do antigénio CD3 exerce apenas uma influência mínima que necessita de ser aumentada pelas interações na superfície das células T de CD3/Ti com outros antigénios CD (ver Andersen et al., supra, pág. 678).

Para além disso, há incerteza em relação ao efeito exacto das interações do antigénio CD na activação das células T. Por exemplo, a análise da perda de variantes de CD4 espontânea (ver por exemplo, Marrack et al., "The Major Histocompatibility Complex Restricted Antigen Receptor On T Cells II. Role Of The L3T4 Product", J. Exp. Med., 158:1077-91 (1983)), bem como experiências de transferência de genes (ver, por exemplo, Gay et al., "Functional Interaction Between Human T-Cell Protein CD4 And The Major Histocompatibility Complex HLA-DR Antigene", Nature, 328:626-29 (1987)) sugerem que a expressão de CD4 aumenta a resposta das Células T a um antigénio específico e que CD4 desempenha uma função particularmente importante quando as concentrações de antigénios não são óptimas ou quan

do a avidéz da célula T para o antigénio/antigénio codificado por MHC é baixa (ver, por exemplo, Regnier-Bigouroux et al., "Accessory Molecules And T Cell Activation I. Antigen Receptor Avidity Differentially Influences T Cell Sensitivity To Inibition By Monoclonal Antibodies To LFA-1 And L3T4", Eur J. Immunol., 16:1385-90 (1986) e Shaw et al., "Susceptibility Of Citotoxic T Lymfocyte (CTL) Clones To Inibition By Anti-T3 And Anti-T4 (But Not Anti-LFA-1) Monoclonal Antibodies Varies With The "Avidity" Of CTL-Target Interaction", J. Immunol. 134 (Nº 5):3019-26 (1985)). Para além disso, quando os mAbs que reagem com CD3 e CD4 são imobilizados no mesmo suporte sólido, aumenta a proliferação das células T expostas aos anticorpos imobilizados. De modo idêntico, quando os mAbs para CD3 e CD8 são acoplados a um suporte sólido, a proliferação das células T regista um aumento superior ao observado após exposição apenas ao anticorpo para CD3 imobilizado (ver, Anderson et al., supra).

No entanto, estudos com o anticorpo monoclonal so nível CD4 indicaram que os anticorpos solúveis inibem a resposta das células T, o que sugere que CD4 pode transmitir um sinal negativo que inibe a activação das células T (ver, por exemplo, Bank et al., J. Exp. Med, 163:1294 (1985); Tite et al., "The Role Of L3T4 In T Cell Activation: L3T4 May Be Both An Ia-Binding Protein And A Receptor That Transduces A Negative Signal", J. Cell. Mol. Immunol, 2:179-90 (1986); e Rosoff et al., "The Role Of The L3T4 Molecule In Mitogen and Antigen-Activated Signal Transduction", Cell, 49:845-53 (1987)).

Os linfócitos B, também conhecidos como células B são precursores de células (plasmáticas) que produzem anticorpos. Quando as células B são estimuladas por um antígeno, necessitando da cooperação das células T auxiliares e de macrófagos, as células B proliferam e diferenciam-se em células plasmáticas e células B de memória. Os antígenos CD que se identificaram nas células B incluem CD19, CD20, CDw40, CD45, CD45R e Bgp95 (um antígeno que não recebeu ainda uma designação CD) (McMichael, Leukocyte Typing III, supra).

Outro antígeno CD com interesse é o antígeno comum aos leucócitos CD45 (L-CA, também conhecido como T200 ou Ly-5). CD45 abrange uma família de glicoproteínas principais com um peso molecular (Mr) de 180 a 220 kDa que se limita às células de linhagens hematopoiéticas [Trowbridge et al., Proc. Nat'l. Acad. USA 72:157-161 (1975); Komuro et al., Immunogenetics 1:452-456 (1975); Scheid et al., Immunogenetics 9:423-433 (1979); Dalchau et al., Eur. J. Immunol., 10:737-744 (1980); e Omary et al., J. Exp. Med. 152:842-852 (1980)]. Isoformas distintas de CD45 provêm da cisão/reparação alternativas de mRNA (splicing). Estas isoformas expressam-se de modo diferente nas sub-populações de linfócitos T e de linfócitos B. Alguns anticorpos monoclonais (mAbs) para o antígeno CD45 humano reconhecem os epítopes compartilhados por todas as isoformas de CD45 com Mr de 220, 205, 190 e 180 kDa. (Cobold et al., Leukocyte Typing III, supra, Capítulo 15, pp 788-803). No entanto, outros mAbs reconhecem apenas a isoforma de CD45 de 220 kDa,

designada por CD45R, que se expressa selectivamente nos linfócitos B e nas sub-populações de células T. (Cobold, supra; Dalchau et al., J. Exp. Med., 153:753-765 (1981); Morimoto et al., J. Immunol. 134: 1508-1515 (1985); e Ledbetter et al., J. Immunol. 135:1819-1825 (1985)). Um outro mAb, UCHL-1, liga-se selectivamente às espécies de 180 kDa que se limitam aos timócitos corticais e a uma sub-população de células T activadas ou de memória [Smith et al., Immunology 58:63-70 (1986)].

Recentemente deduziram-se, a partir de sequências de nucleotídicas de cADN, as estruturas primárias de CD45 (L-CA) da ratazana [Thomas et al., Cell, 41:83-93 (1985) e Barclay et al., EMBO J. 6:1259-1264 (1987)], do rato [Saga et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 83:6940-6944 (1986); W.C. Raschke, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:161-165 (1987); Thomas et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:5360-5363 (1987) e Saga et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84:5364-5368 (1987)] e humano [Ralph et al., EMBO J. 6:1251-1257 (1987) e Steuli et al., J. Exp. Med. 166:1548-1566 (1987)]. CD45 é uma proteína de membrana completa com um grande segmento citoplásmico de 705-707 aminoácidos, um segmento de transmembrana de 22 aminoácidos e um domínio extracelular que compreende 400 a 550 aminoácidos. As diversas isoformas de CD45 que se originaram por cisão/reparação (splicing) alternativas de RNA das transcrições primárias de um único gene, têm diferentes domínios extracelulares, mas possuem os mesmos segmentos de transmembrana e citoplásmicos (Barclay supra; Ralph, supra e Streuli, supra). O segmento ci-

toplásmico tem dois domínios homólogos altamente conservados com 300 resíduos aproximadamente.

Os estudos para tentar definir a função de CD45 proporcionaram resultados contraditórios (Cobold, supra). Referiu-se que os mAbs para os antigénios humanos ou do rato, inibiam a proliferação das células B e T [Harp et al., J. Immunol. 133:10-15 (1984); Bernabeu et al., Eur. J. Immunol. 17:1461-1466 (1987) e Mittler et al., J. Immunol. 138:3159-3166 (1987)], a diferenciação de células [Yakura, J. Exp. Med. 157:1077-1088 (1983)] e a actividade das células assassinas naturais (NK) e das células T citotóxicas [Seaman et al., J. Immunol. 127:982-986 (1981); Newman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 79:3858-3862 (1982); Nakayama et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76:1977-1981 (1979) e Lefrançois et al., Nature, (London) 314:499-452 (1985)]. No entanto, também foi referido que, sob determinadas condições, os mAbs anti-CD45 aumentam a proliferação celular [Cobold, supra; Ledbetter, supra e Martorell et al., Eur J. Immunol. 17:1447-1451 (1987)]. Thomas, supra, sugeriu que a porção citoplásmica de 30 kDa da molécula, com os seus dois domínios homólogos conservados, pode desempenhar um papel crítico na função de CD45. Recentemente, descobriu-se que esses domínios eram homólogos de uma proteína principal de baixo peso molecular, tirosina fosfatase, isolada a partir das fracções solúveis e de partículas da placenta humana, [Tonks et al., J. Biol. Chem., 263:6722-6730 (1988); e Charbonneau et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:7182-7186

(1988) 7. Isto sugere que CD45 é uma tirosina-fosfatase de proteína ligada à membrana que pode funcionar interagindo com outras moléculas associadas à membrana. Na presente invenção, os heteroconjugados de anticorpos podem estar presentes para reagirem com os antígenos nos linfócitos a fim de regular a actividade linfocitária. Alternativamente, podem ser usados anticorpos bi-específicos, isto é, anticorpos que contêm regiões de ligação reactivos com dois antígenos o CD de superfície celular diferentes, para regular a actividade dos linfócitos.

RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção clarifica algumas das incertezas anteriormente referidas e proporciona novos heteroconjugados de anticorpos e anticorpos bi-específicos. Os heteroconjugados de anticorpos comportam duas regiões de anticorpos reactivos pelo menos, com diferentes antígenos de superfície que se expressam nos linfócitos, tais como células T, estando os anticorpos ligados entre si por ligação cruzada. Alguns destes heteroconjugados aumentam a transdução de sinal na actividade das células T, conforme se determinou pela sua capacidade para aumentar a concentração de cálcio livre intracelular ($(Ca^{2+})_i$) nas células T para concentrações de proteínas aproximadamente, duas vezes inferiores às que se observaram apenas com o anticorpo para o antígeno CD3, isoladamente.

Para além disso, os heteroconjugados da presente invenção incluem os que são capazes de inibir a activação e a função dos linfócitos.

De acordo com um aspecto preferido da presente invenção, submeteu-se um anticorpo reactivo monoclonal com o complexo receptor CD3/Ti ou os seus componentes, a uma ligação cruzada com um anticorpo monoclonal reactivo com um segundo antígeno na superfície das células T, tal como o antígeno CD2, CD4, CD6 ou CD8, para formar heteroconjugados que aumentam a transdução de sinal na activação de células T. De acordo com outro aspecto preferido, fez-se a ligação cruzada de um anticorpo monoclonal reactivo com o antígeno CD5 da superfície das células T, com um anticorpo monoclonal reactivo com um segundo antígeno na superfície das células T, tal como os antígenos CD4, CD6 ou CD8. Um aspecto particularmente preferido refere-se a heteroconjugados constituídos por um anticorpo para CD3 em ligação cruzada com um anticorpo para CD4.

De acordo ainda com um outro aspecto preferido submeteu-se um anticorpo reactivo com o antígeno CD45 da superfície das células T à ligação cruzada com um anticorpo monoclonal reactivo com um segundo antígeno da superfície das células T tal como os antígenos CD2, CD3, CD5 ou CD28, para formar heteroconjugados que inibem a activação e proliferação dos linfócitos. Um aspecto especialmente preferido refere-se a heteroconjugados constituídos por um anticorpo CD3 em ligação cruzada a um anticorpo

reactivo com o antigénio CD45 ou com as isoformas de CD45.

A presente invenção também proporciona anticorpos monoclonais bi-específicos constituídos por uma primeira região de ligação reactiva com um primeiro antigénio de superfície, expresso nos linfócitos e uma segunda região de ligação reactiva com um segundo antigénio linfocítico, na mesma célula. Alguns destes anticorpos bi-específicos aumentam a transdução de sinal na activação de células T e outros inibem a activação e a função de linfócitos. Em particular, reforçam a activação de células T as associações CD3/CD4, CD3/CD8, CD3/CD2, CD5/CD4 e CD5/CD8.

A presente invenção também engloba métodos de tratamento de linfócitos com os heteroconjugados e anticorpos bi-específicos da presente invenção, para aumentar ou inibir a activação dos linfócitos na produção de respostas celulares imunológicas. Estes produtos, podem utilizar-se em composições farmacêuticas tais como as que compreendem uma quantidade eficaz, de pelo menos um heteroconjugado da presente invenção e um veículo aceitável em farmácia. Deste modo, pode utilizar-se os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos, os métodos e as composições da presente invenção na terapia imunológica para aumentar ou regular a resposta imunológica, por exemplo, no tratamento de doenças infecciosas, carcinomas, SIDA e doenças de auto-imunidade.

BREVE DESCRIÇÃO DOS GRÁFICOS

A Figura 1 é uma representação gráfica comparativa do aumento da concentração do cálcio citoplásmico livre ($[Ca^{2+}]_i$) ao longo do tempo após a estimulação dos linfócitos do sangue periférico com diversas concentrações de (A) um heteroconjugado CD3/CD4 de um aspecto da presente invenção, G19-4/G17-2, ou (B) do anticorpo monoclonal anti-CD3, G19-4.

A Figura 2, é uma representação gráfica comparativa da resposta de $[Ca^{2+}]_i$ e da percentagem de células que responderam ao longo do tempo após a estimulação dos linfócitos no sangue periférico (PBLs) ou das células T CD4⁺ com um heteroconjugado CD3/CD4 da presente invenção, G19-4/G17-2. Também se apresenta o efeito inibidor resultante do tratamento prévio das células com o anticorpo monoclonal anti-CD4, G17-2, seguida da estimulação com o heteroconjugado.

A Figura 3 representa as titulações comparativas da actividade de $[Ca^{2+}]_i$ do heteroconjugado G19-4/G17-2 da presente invenção (■) ou do anticorpo monoclonal anti-CD3 G19-4 (□), nas células T CD4⁺ na presença de 5mM/EGTA.

A Figura 4 inclui representações gráficas comparativas do aumento de fosfatos de inositol ao longo do tempo depois da estimulação das células T CD4⁺ com anti-CD3, G19-4 (●) ou um heteroconjugado CD3/CD4 da presente invenção,

G19-4/G17-2 (Δ) a 1 $\mu\text{g/ml}$. Apresentam-se os níveis de fosfato de inositol em controlos não estimulados (O) a $t = 0$ e $t = 10$ minutos. O painel A mostra o aumento de fosfato de inositol (InsP1), o painel B mostra o aumento de fosfato de inositol (InsP2) e o painel C mostra o aumento do fosfato de inositol (InsP3).

A Figura 5 representa duas experiências independentes em que o aumento de InsP1 se mede a seguir à estimulação das células T CD4^+ , tratadas previamente com anti-CD4 conjugado com biotina (G17-2), quer com anti-CD3 (G19-4), G17-2, um heteroconjugado CD3/CD4 (G19-4/G17-2), quer com avidina ou suas associações, conforme indicado.

A Figura 6 mostra os efeitos de um anticorpo monoclonal anti-CD3 (CD3 Mono), de um homoconjugado CD3/CD3 (CD3 Homo), de um homoconjugado CD4/CD4 (CD4 Homo) e de um heteroconjugado da presente invenção CD3/CD4 (CD3+4 Hetero) na proliferação das células T, conforme indicado pela incorporação de $[^3\text{H}]$ -timidina pelas células T CD4^+ , com ou sem PMA (acetomiristato de forbolo) ou anticorpos para CD28.

A Figura 7 é uma representação gráfica comparativa da resposta proliferativa das células T CD4^+ conforme indicado pela incorporação de ^3H -timidina em função da concentração quer de G19-4 (CD3 Mono)+ PMA (\longleftrightarrow), G19-4 + anti-CD28 (CD28) ($\nabla\text{---}\nabla$), de um heteroconjugado CD3/CD4 (CD3+ 4 Hetero)+PMA ($\blacktriangledown\text{---}\blacktriangledown$),

um heteroconjugado CD3/CD4 + α -CD28 ($\nabla \cdots \nabla$), um homoconjugado CD3/CD3 (CD3 Homo)+ PMA ($\leftarrow \bullet \rightarrow$) quer de um homoconjugado CD3/CD3 + α -CD28 ($\nabla \cdots \nabla$).

A Figura 8 mostra a percentagem de células T CD4⁺, que passaram o primeiro, segundo ou terceiro ciclos celulares, após estimulação das células T durante 3 dias quer com PHA (fito-hemaglutinina), com um heteroconjugado CD3/CD4, da presente invenção, G19-4/G17-2, com um homoconjugado CD3/CD3, G19-4/G19-4, com um heteroconjugado de controlo CD3/CD8, G19-4/G10-1 e um homoconjugado CD4/CD4, G17-2/G17-2.

A Figura 9 é uma representação gráfica comparativa da inibição da resposta proliferativa das células T, induzida pelo mAb anti-CD3, G19-4, imobilizado, tal como é indicado pela incorporação quer de [³H]-timidina (●) sozinha, quer em função da concentração de mAb anti-CD5, 9,4 (○) ou de mAb anti-p97, 96,5 (□), sem (A) ou com (B) PMA (também se apresenta para comparação a proliferação com mAb anti-CD45, 9,4, em solução (Δ)); apresentam-se as médias; os erros-padrão foram < 15%.

A Figura 10 inclui gráficos que representam a regulação da transdução de sinal nas células T pelo receptor CD45 conforme se determinou pelos aumentos de [²⁺Ca²⁺]_i ao longo do tempo após a ligação cruzada dos receptores nas células T, quer sozinhos quer conjuntamente com mAb anti-CD45, 9,4 ou com mAb

anti-CD45R, 3AC5, de acordo com o descrito no Exemplo 4, infra. (A média de $[Ca^{2+}]_i$ indica-se à esquerda e a percentagem de células com resposta apresenta-se à direita para cada experiência; as setas indicam os tempos de adição de mAbs ou de avidina).

A figura 11 representa, em esquema, dez formas de anticorpos produzidos por uma hibridoma híbrida como está descrito no exemplo 5, infra.

A figura 12 são gráficos representando a regulação da transdução de sinal em células T por anticorpos bi-específicos, da presente invenção, como determinado pelos aumentos de $[Ca^{2+}]_i$ e como está descrito no exemplo 6 infra, (12A= $[Ca^{2+}]_i$ médio, 12B= percentagem de células com resposta; as setas representam o tempo de adição de anticorpos; (—)= 45 μ g de anticorpo bi-específico CD4/CD5; (.....)=45 μ g do anticorpo CD5 = sózinho; (----) 45 μ g do anticorpo CD4 sózinho; (-.-.-.) = uma mistura de 22,5 μ g de anticorpo CD5 com 22,5 μ g de anticorpo CD4.

A figura 13 representa substratos fosforilados na tirosina da linha de célula T CEM CD₃⁺ (isto é por activação da tirosina-quinase(s) apropriada(s), no decurso de zero, 2 e 5 minutos, como resposta a vários estímulos incluindo anticorpos CD3, CD4 e CD8, usados em separado (cursos de tempo B, C, D); ou como misturas (CD3 + CD4, mistura e mistura CD3 + CD8, tempos E e H); ou como anticorpos híbridos (bi-específicos)

(CD3/CD4 HYB e CD3/CD8 HYB, tempos F e I); ou como anticorpos heteroconjugados (CD3/CD4 HC e CD3/CD8 HC; tempos G e J); como está descrito no Exemplo 6, infra.

A figura 14 representa a activação de tirosina-quinase(s) pela fosforilação de vários substratos na tirosina, como está descrito no exemplo 6, infra. As estimulações incluem anticorpos CD5 e CD4 sozinhos (em tempos B e F); ou como uma mistura (mistura CD5 + CD4, tempo C) ou como um anticorpo híbrido (bi-específico) (CD5/CD4 HYB, tempo D); ou como um heteroconjugado de anticorpo (CD5/CD4 HC, tempo E).

A figura 15 representa a activação de tirosina-quinase(s) pela fosforilação de substrato de tirosina vários, como está descrito no exemplo 6, infra. As estimulações incluíram os anticorpos CD5 e CD8 sozinhos (tempos B e F); ou numa mistura (mistura de CD5 + CD8, tempo C); ou como um anticorpo híbrido (bi-específico) (CD5/CD8 HYB, tempo D); ou como um heteroconjugado de anticorpo (CD5/CD8 HC, tempo E).

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

No sentido de tornar mais compreensível a invenção que aqui se descreve, apresenta-se a descrição pormenorizada seguinte.

A presente invenção refere-se a novos anticorpos

heteroconjugados e a anticorpos bi-específicos à sua utilização para aumentar ou inibir a activação e funcionamento dos linfócitos. Mais em particular, a presente invenção, refere-se a heteroconjugados constituídos, pelo menos, por dois anticorpos de ligação cruzada entre ambos reagindo, cada um dos anticorpos com um antigénio diferente da superfície celular dos linfócitos. De preferência, para se intensificar a actividade linfocítica um dos corpos do conjugado reage com o receptor da célula T (Ti) ou com o seu complexo antigénico CD3 associado e o outro anticorpo reage com um segundo antigénio da superfície da célula T, tal como os antigénios CD (por exemplo, CD2, CD4, CD6 ou CD8). Em alternativa, um dos anticorpos do conjugado reage com um antigénio CD5 e o outro anticorpo reage com um segundo antigénio da superfície da célula T tal como CD4, CD6 ou CD8. O heteroconjugado CD4/CD45 também causa a intensificação da actividade da célula T. Para se originar inibição, um dos anticorpos dos heteroconjugados é, de preferência, reactivo com os antigénios da família CD45 (isoformas) e o outro anticorpo é reactivo com os antigénios da superfície das células T, tais como CD2, CD3, CD5 ou CD28.

Os anticorpos monoclonais bi-específicos, desta invenção comportam duas regiões de ligação reactivas, cada região reactiva em ligação com um antigénio diferente na superfície dos linfócitos. De preferência, para aumento da actividade linfocítica, uma das regiões de ligação é reactiva com o receptor de células T (Ti) ou o seu complexo antigénico CD3 associa

do e a outra região de ligação é reactiva com um segundo antígeno de superfície de células T, tal como os antígenos CD (por exemplo, CD2, CD4, CD6 ou CD8).

Alternativamente, uma das regiões de ligação do anticorpo bi-específico é reactiva com antígeno CD5 e a outra região de ligação é reactiva com um segundo antígeno da superfície de células T, tal como CD4, CD6 ou CD8. Para inibição da actividade linfocítica uma das regiões de ligação dos anticorpos bi-específicos tem reactividade, de preferência, com uma das isoformas CD45 e a outra região de ligação é reactiva com um antígeno da superfície de células T, tal como CD2, CD3, CD5 ou CD28.

Sem considerar os aspectos teóricos, crê-se que os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos aqui descritos, quando reagem com os linfócitos, actuam por ligação aos seus respectivos antígenos da superfície das células, levando esses antígenos a uma estreita proximidade um do outro, um passo que pode simular o agrupamento conjunto que ocorre por exemplo entre o receptor das células T e CD4 após o contacto das células T auxiliares com as células que apresentam antígenos durante a activação das células T [ver, por exemplo, A. Kupfer et al., "Coclustering Of CD4 (L3T4) Molecule With The T-Cell Receptor Is Induced By Specific Direct Interaction Of Helper T Cells And Antigen-Presenting Cells, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:5888-5892 (1987)]. Esta interacção entre os antígenos das

células T na superfície celular parece intensificar o sinal de transmembrana mediado por CD3/Ti e, desse modo, a activação das células T.

Apesar de não se conhecer o mecanismo do efeito do antigénio CD45 nos linfócitos, os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos CD45, aqui descritos, podem funcionar modificando funcionalmente outros receptores dos linfócitos, quando se encontram em estreita associação física com eles, de que resulta, por exemplo, a inibição, após a agregação de determinados receptores CD, tais como o antigénio CD3. A homologia recentemente descrita, entre os domínios citoplásmicos de CD45 e a proteína principal tirosina fosfatase da placenta humana, sugere que os primeiros são de facto, uma proteína tirosina fosfatase ligada à membrana que funciona modificando a transdução do sinal nos leucócitos por desfosforilação dos resíduos de tirosilo chave, noutras moléculas associadas à membrana, tais como a cadeia zeta de CD3. [Klausner et al., J. Biol. Chem. 262:12654-12659 (1987)]. CD45 pode também modificar a actividade da tirosina quinase da proteína associada com CD4 que funcionaria normalmente regulando a transdução de sinal dirigida pelo antigénio. [Rud et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:5190-5194 (1988)]. Em alternativa, a tirosina quinase associada a CD4 pode fosforilar o antigénio CD45 nos seus resíduos tirosilo e alterar a sua actividade. Isto podia explicar o único aumento de actividade obtido como resultado da ligação cruzada dos receptores de CD4 e CD5, conforme se indica nos exem

plos, infra. Este modelo preconizaria que a fosforilação dos re síduos tirosilo chave precede e é necessária para a mobilização do cálcio. Uma forma integral da membrana da enzima, que funcio na apenas em estreita proximidade com as outras proteínas asso ciadas à membrana, serviria para localizar a regulação da pro- teína tirosina quinase/fosfatase em moléculas específicas da superfície celular. Assim, pensa-se que os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos da presente invenção que contêm regiões reactivas com dois antigénios possam actuar aumentando ou inibindo a activação e funcionamento dos linfócitos.

Deverá ter-se em conta que a regulação das célu- las T, isto é, a inibição, de acordo com a presente invenção, pode ser uma regulação de todas as células T ou uma regulação de uma sub-população especial ou de um clone particular de cé- lulas T. A regulação da totalidade das células T resulta do contacto das células T com heteroconjugados ou com anticorpos bi-específicos que regulem o agregado total ou a população to- tal das células T.

Estes heteroconjugados e anticorpos bi-específi- cos são constituídos por anticorpos reactivos com os antigénios das células T, que se encontram em todos os linfócitos T. Um de entre esses heteroconjugados é o heteroconjugado CD3/CD2, da presente invenção, sendo CD3 e CD2 antigénios da totalidade das células T (ver, por exemplo, J. A. Ledbetter et al., Perspecti- ves In Immunogenetics And Histocompatibility, supra, Quadro 1).

Contudo, pode obter-se uma regulação mais específica por intermédio do heteroconjugado ou do anticorpo bi-específico adequados. Por exemplo, nos casos em que é desejável activar apenas uma sub-população específica de células T, tal como as sub-populações auxiliar e supressora, pode obter-se este resultado mediante a construção de heteroconjugados ou de um anticorpo bi-específico em que uma das regiões de ligação de anticorpo se liga com aquela sub-população especial de células T, isto é, uma região tem ser reactiva com um antigénio específico para aquela sub-população. A outra região de ligação é específica, de preferência para um antigénio da totalidade das células T. De acordo com este aspecto, então, os heteroconjugados CD3/CD4 ou CD5/CD4, ou os anticorpos bi-específicos, da presente invenção, aumentam especificamente a activação das células auxiliares T (sendo CD4 específico da sub-população das células T auxiliares), enquanto os heteroconjugados CD3/CD8 ou CD5/CD8 ou os anticorpos bi-específicos aumentam, especificamente a activação da sub-população das células supressoras T (sendo CD8 específico para a subpopulação de células T supressoras).

Alternativamente, um heteroconjugado ou os anticorpos bi-específicos da presente invenção, CD3/CD45 inibe especificamente, a activação das células T portadoras de antígenos CD45. Apesar das isoformas do receptor de CD45 se expressarem apenas nas sub-populações de células T, os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos da presente invenção, que

contêm uma região de ligação reactiva com as isoformas de CD45, também pode ser utilizado para a regulação desses sub-grupos de células T.

Finalmente, quando se pretende uma regulação clonotípica, isto é, a regulação de clones bi-específicos de células T, o heteroconjugado da presente invenção deverá conter uma região anti-clonotípica (Ti) como um dos seus componentes, isto é, uma região que reaja com a região variável do receptor de célula T do clone que se pretende regular. Deste modo, nos casos em que uma célula T clonotípica for incapaz de reconhecer ou de responder a um antigénio especial, isto é, a um antigénio viral ou de tumor ou a sua resposta é suprimida, pode utilizar-se um heteroconjugado da presente invenção constituído por uma região de ligação anti-clonotípica específica para essa célula T (Ti/CD4, Ti/CD8, Ti/CD6, Ti/CD2), para regular aqueles clones de células T. Como alternativa para inibir um clone particular de células T, pode utilizar-se um heteroconjugado ou um anticorpo bi-específico composto por Ti/CD45 (ou a isoforma de Ti/CD45). De acordo com este aspecto, parece que o componente Ti do heteroconjugado ou anticorpo bi-específico substitui essencialmente o antigénio na regulação da célula T específica. A outra região de ligação do heteroconjugado ou do anticorpo bi-específico pode ser uma pan-célula T específica ou uma sub-população de região de ligação específica ou uma região reactiva com CD45 ou com a isoforma de CD45.

Deste modo, os anticorpos que constituem os heteroconjugados da presente invenção, incluem qualquer anticorpo reactivo com um antigénio da superfície dos linfócitos. De acordo com um aspecto preferido, um dos anticorpos do conjugado reage com Ti ou com o antigénio CD3 da célula T. De acordo com um outro aspecto preferido, um anticorpo que reage com um antigénio CD3 da superfície da célula T tem reacção cruzada com um anticorpo que reage com um antigénio CD4 na superfície da célula T.

Outros anticorpos que pode constituir os heteroconjugados da presente invenção incluem, mas não se limitam a, anticorpos que reagem com outros antigénios CD, por exemplo, CD2, CD5, CD6, CD7, CD8, CD28, nos linfócitos (ver, por exemplo, A. Bernard et al., (eds.) Leukocyte Typing, Springer Verlag (Heidelberg 1984); e J. A. Ledbetter et al., in Perspectives In Immunogenetics And Histocompatibility, supra). Assim, de acordo com o aspecto preferido, procede-se à ligação cruzada de um anticorpo que reage com o antigénio de superfície de células T CD5, com um anticorpo que reage com os antigénios CD4, CD6 ou CD8 para formar um heteroconjugado da presente invenção. Ainda num outro aspecto preferido, procede-se à ligação cruzada de um anticorpo que reage com o antigénio CD3 da superfície da célula T, com um anticorpo que reage com o antigénio CD45 ou com a isoforma de CD45 na superfície celular dos linfócitos.

Os anticorpos que constituem os heteroconjugados

da presente invenção podem ser policlonais ou, de preferência, monoclonais, podem ser moléculas intactas de anticorpos ou fragmentos contendo a região de ligação activa do anticorpo, por exemplo, Fab ou F(ab')₂, e podem produzir-se utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade (ver, por exemplo as publicações que descrevem a preparação dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD5 e anti-CD2 a que se faz referência no Exemplo 1-3, adiante). Para além disto, os anticorpos monoclonais para muitos dos antigénios CD tais como os antigénios CD2, CD3, CD4 e CD5 encontram-se comercialmente disponíveis (Becton Dickinson, Mountainview, CA) ou podem obter-se na International Leucocyte Typing Workshops. Se se utilizarem anticorpos monoclonais, os anticorpos podem ser de rato ou de origem humana ou anticorpos quiméricos [ver, por exemplo V. T. Oi, "Chimeric Antibodies", Biotechniques, 4 (Nº 3): 214-221 (1986)].

Os anticorpos que constituem os heteronjugados da presente invenção podem ligar-se por covalência, por técnicas bem conhecidas na especialidade tais como a utilização de reagentes heterobifuncionais de ligação cruzada, GMBS (maleimidobutriloxi-succinimida) ou SPDP (3-(2-piridilditio-propionato) de N-succinimidilo [ver, por exemplo, R.R. Hardy, "Purification And Coupling Of Fluorescent Proteins For Use In Flow Cytometry", Handbook Of Experimental Immunology, Volume I, Immunochemistry, D. M. Weir et al (eds.), pp. 31.4-31.12 4ª Edição (1986) para uma discussão das técnicas convencionais de acoplamento de anticorpos].

Deve entender-se, no entanto, que a presente invenção engloba qualquer heteroconjugado ou anticorpo bi-específico que compreende, pelo menos duas moléculas ou regiões que reajam como diferentes antigénios de linfócitos, no mesmo linfócito, actuando esse heteroconjugado ou o anticorpo bi-específico de modo a intensificar ou a inibir a activação e funcionamento dos linfócitos. A presente invenção contempla os heteroconjugados e anticorpos bi-específicos que reagem com os antigénios nas células B, assim como nas células T.

É evidente que além dos anticorpos, os heteroconjugados da presente invenção podem incorporar ligandos capazes de se ligarem aos receptores dos linfócitos. Demonstrou-se, por exemplo, que o receptor CD4 reage com o ligando gp120 (um receptor glicoproteico do Virus da Imunodeficiência Humana ou "HIV" [Linsley et al., J. Virology 62:3695-3702 (1988)]. Deste modo, utilizar-se-ia um heteroconjugado constituído pelo anticorpo anti-CD3 em ligação cruzada com o ligando gp120 para aumentar a actividade das células T pela ligação cruzada com receptores de CD3 e CD4. Também se contemplam outros conjugados de ligandos que consistem num ligando reactivo com um receptor da célula T em ligação cruzada com um ligando que reage com um receptor diferente da célula T. Estes incluem factores de crescimento tais como a interleucina-1 ("IL-1"), IL-2, IL-4, etc. Exemplificam-se os heteroconjugados da presente invenção e a sua utilização na activação das células T, de acordo com um aspecto preferido no qual se conjuga um anticorpo reactivo com um antigénio CD3 na superfície

das células T foi conjugado com um anticorpo que reage com um antígeno CD4 para formar um novo heteroconjugado da presente invenção, CD3/CD4. O tratamento das células T CD4⁺ com este heteroconjugado originou o aumento da transdução de sinal nas sub-populações auxiliares de célula T, conforme indica um aumento significativo na mobilização intercelular de $[Ca^{2+}]_i$ e um aumento substancial na formação dos fosfatos de inositol 1,2 e 3, quando comparado com tratamento das células apenas com o anticorpo para CD3. Esta actividade intensificadora do sinal do heteroconjugado CD3/CD4 não se deve simplesmente à oligomerização, uma vez que os homoconjugados CD3/CD3 e CD4/CD4 ou as suas misturas não apresentaram este acréscimo de actividade. E demonstrou-se previamente na especialidade que as misturas de anti-CD3 e de anti-CD4 decresciam em vez de aumentarem esta actividade [ver, por exemplo, P.M. Rosoff et al., supra]. Para além disso, demonstrou-se que a actividade aumentada apresentada pelo conjugado foi inibida por tratamento prévio das células T com um anticorpo monoclonal solúvel para CD4.

Além disso, o heteroconjugado CD3/CD4 exibiu, uma nova actividade funcional na activação das células T, isto é, o heteroconjugado induziu a proliferação das células T CD4⁺, na presença de um anticorpo monoclonal reactivo com CD28 e mostrou-se completamente co-mitogénico com a estimulação de CD28 mesmo em concentrações tão baixas como 100 ng/ml. Não se descobriu esta co-mitogenicidade utilizando apenas o anticorpo para CD3 ou para os homoconjugados CD3/CD3 ou CD4/CD4. Verificou-se, para além

disso, que o heteroconjugado CD3/CD4, da presente invenção, em associação com o anticorpo monoclonal CD28 é capaz de conduzir, significativamente, as células T através do ciclo celular, entrando uma fracção significativa de células num segundo ciclo celular nos primeiros três dias de estimulação. Pelo contrário, o anticorpo para CD3, sózinho, os homoconjugados CD3/CD3 ou CD4/CD4 não induzem uma transição significativa no ciclo celular. Descobriu-se, para além disso, que o heteroconjugado CD3/CD4 causava a modulação de ambos os antigénios CD3 e CD4 da superfície das células T, conduzindo a decréscimo na expressão superficial de CD4. Estes resultados indicam que o heteroconjugado não fixa simplesmente o receptor da célula T à superfície da célula T, como se demonstrou, previamente, ser o caso quando se utiliza o anticorpo para CD3 imobilizado. (ver, por exemplo, J. A. Ledbetter et al., J. Immunol., supra).

Os resultados obtidos com o heteroconjugado CD3/CD4 demonstram que o antigénio CD4 na superfície da célula T desempenha uma função activa positiva na transdução do sinal durante a activação de células T das células T auxiliares CD4⁺ por intermédio de uma interacção física entre o complexo receptor CD3/Ti e o antigénio CD4.

O mecanismo molecular que se encontra subjacente à capacidade do heteroconjugado CD3/CD4 para aumentar a transdução do sinal não está bem esclarecido. Pelo menos um dos efeitos da interacção de CD4 com CD3/Ti parece ser o aumento da produção de fosfato de inositol, o que sugere que CD4 pode promover a hidrólise

induzida por CD3/Ti dos fosfo-inositidos da membrana, levando à produção de trifosfato de inositol. Isto é fundamentado nos dados experimentais da presente invenção que indicam que a actividade geradora de fosfato de inositol do heteroconjugado CD3/CD4 é inibida pela reacção das células com anticorpo monoclonal solúvel para CD4. Esta inibição pode ser uma consequência da dissociação de CD4 e de CD3/Ti, induzida pelo anticorpo, se apenas CD3/Ti for um transdutor de sinal, menos eficiente. Em alternativa a interacção independente de CD4 com o seu anticorpo pode transmitir um sinal negativo que iniba a criação de fosfatos de inositol.

Uma vez que se crê que a geração de trifosfato de inositol (InsP3) provoca indirectamente a mobilização do cálcio citoplásmico nas células T, a interacção de CD4 com CD3/Ti também parece promover a libertação de cálcio a partir das reservas intracelulares. A comparação das curvas de resposta à dose do heteroconjugado CD3/CD4 em função do anticorpo para CD3 na mobilização de $[Ca^{2+}]$ indica que se obteve uma resposta detectável de $[Ca^{2+}]$ proveniente da interacção de muito menos receptores nas células T quando se estimulam CD4 e CD3/Ti na proximidade um do outro, isto é, quando se utiliza o heteroconjugado CD3/CD4, do que quando se estimula apenas CD3/Ti (Ver Figura 3). Deste modo uma das propriedades do heteroconjugado da presente invenção, CD3/CD4, é a sua capacidade para activar as células T abaxios níveis de ocupação do receptor.

Uma vez que se sabe que a geração de fosfato de inositol e a mobilização do cálcio se encontram associadas à activação

das células T, o que conduz à proliferação das células T, os dados aqui apresentados demonstram claramente que, independentemente do mecanismo de acção, o heteroconjugado CD3/CD4 da presente invenção é útil no aumento da activação e proliferação das células T.

A presente invenção, também engloba outros heteroconjugados que, tal como o heteroconjugado CD3/CD4, proporcionam capacidades de sinalização aumentadas na activação das células T. Por exemplo, um heteroconjugado CD3/CD2, um heteroconjugado CD3/CD6, um heteroconjugado CD3/CD7 e um heteroconjugado CD3/CD8, da presente invenção, também proporcionam um aumento de actividade na mobilização do cálcio. Para além disso, de acordo com a presente invenção, também se construíram diversos heteroconjugados contendo anti-CD5 (por exemplo, um heteroconjugado CD5/CD4 e um heteroconjugado CD5/CD6 e um heteroconjugado CD5/CD8) tendo proporcionado aumento na actividade de mobilização de $[Ca^{2+}]$ nas células T.

Os heteroconjugados da presente invenção que incorporam um anticorpo que reage com o antigénio CD45 ou com as suas isoformas, úteis para a inibição da activação e funcionamento dos linfócitos, ou para o aumento da activação e funcionamento das células T, exemplificam-se de acordo com um aspecto preferido no qual se conjuga um anticorpo que reage com o antigénio CD3 com um anticorpo que reage com o antigénio CD45 para formar um novo heteroconjugado CD3/CD45 da presente invenção. O tratamento das células T com este heteroconjugado originou a anula-

ção da activação das células T, mediada por CD3 (sinal da transmembrana) tal como é indicado por um decréscimo significativo na mobilização do cálcio intracelular. Além disso, realizou-se a indução da interacção entre os diversos receptores CD na superfície das células T, tais como os receptores CD3, CD2, CD5 ou CD28 e o receptor CD45, utilizando-se anticorpos monoclonais para efectuar uma ligação cruzada do receptor de CD45 nos linfócitos, com outro receptor CD no mesmo linfócito. Esta ligação cruzada originou a anulação do aumento de $[Ca^{2+}]_i$ que surgiu da formação de homo-agregados de antigénios de células T induzidos por receptores comuns de ligação cruzada na superfície celular. Inibiu-se a proliferação das células T iniciada pela estimulação com o anticorpo monoclonal imobilizado, anti-CD3, pelo anticorpo anti-CD45 ou pelo anticorpo anti-CD45R, quando imobilizado na mesma superfície, mas não quando em solução. De modo idêntico, inibiu-se a proliferação das células T após estimulação dos receptores para CD2 e CD28 pelos anticorpos anti-CD2 e anti-CD28, respectivamente, quando se efectuou uma ligação cruzada de um anticorpo CD45 com um anticorpo anti-CD2 ou anti-CD28, mas não quando se ligou um anticorpo anti-CD45, separadamente, à superfície celular. Estes resultados sugerem que os heteroconjugados constituídos por anticorpos que reagem com CD45 ou com as isoformas de CD45, tal como CD45R, e por anticorpos que reagem com antigénios CD nas células T, podem ser úteis para regular as células.

Em contrapartida, o acréscimo de $[Ca^{2+}]_i$ induzido pela formação de homoagregados dos receptores CD4 nas células T, amplificou-se fortemente quando se procedeu à ligação

cruzada do receptor CD4 com o receptor CD45 utilizando anticorpos monoclonais. Deste modo, também se pode utilizar um novo heteroconjugado constituído pelo anticorpo anti-CD4 e pelo anticorpo reactivo com CD45 ou com as isoformas de CD45R nas células T, para aumentar a função de células T de todas as células CD4 positivas ou das sub-populações de células CD4 definidas pela expressão das isoformas CD45.

A presente invenção também abrange anticorpos monoclonais bi-específicos comportando uma região de ligação reactiva com um antigénio linfocítico e a outra região de ligação com um segundo antigénio na mesma célula.

Os métodos para a produção dos anticorpos bi-específicos, da presente invenção, incluem a fusão de duas hibridomas iniciais, uma das quais pré-seleccionada para ser sensível ao meio HAT sendo a outra "envenenada" com uma dose letal de iodo-acetamida antes da fusão celular. Clark et al., em "Hybrid Antibodies for Therapy; Prog. Allergy Waldmann, Ed. 45:31-49, Basileia, Kergen, 1988; e em "T-Cell Killing of Target cells induced by hybrid antibodies", J. Natl. Cancer Inst. 79:1393-1401, 1987 Este método foi adaptado para ser utilizado na presente invenção, como está descrito, muito pormenorizada-mente, no Exemplo 5, infra. Outros métodos incluem a produção de uma célula quadroma ou trioma, como descrito na Patente de Invenção norte-americana 4.474.893 ou aplicando os métodos químicos descritos por Brennan et al., Science 229:81-83, 1985.

As hibridomas híbridas, da presente invenção produzidas mediante aplicação do método descrito, posteriormente, no Exemplo 5, e que produzem anticorpos bi-específicos, desta invenção, foram depositadas na American Culture Type Collection-"ATCC", em Rockville, Maryland, ao abrigo do Tratado de Budapeste e são aí identificadas como segue:

<u>Hibridoma híbrida</u>	<u>Nº de aceitação ATCC</u>	<u>Data de depósito</u>
HFA 19.2 (CD3/CD4)		
HFD 112.1 (CD3/CD8)		
HFB 75.5 (CD5/CD4)		
HFC 80.6 (CD5/CD8)		
HFE 16.4 (CD3/CD2)		
HFF 49.1 (CD4/CD45)		

...

As regiões de ligação reactivas que contêm os anticorpos bi-específicos desta invenção, incluem as regiões reactivas com um antigénio superficial de linfócitos. Em um aspecto preferido, uma das regiões de ligação do anticorpo bi-específico é reactiva com o antigénio da célula T CD3 ou Ti.

De acordo com um outro aspecto preferido, o anticorpo bi-específico contém uma primeira região de ligação reactiva com o antigénio da célula T, CD3, e uma segunda reacção de ligação reactiva com o antigénio CD4 na superfície das células T.

Outros anticorpos monoclonais bi-específicos da presente incluem aquelas regiões de ligação reactivas com outros antigénios CD por exemplo, CD2, CD5, CD6, CD7, CD8, e CD28 dos linfócitos. De acordo com outro aspecto preferido da presente invenção, é produzido um anticorpo bi-específico comportando uma região de ligação reactiva com o antigénio CD5 da superfície da célula T e uma região de ligação reactiva com os antigénios CD4, CD6 ou CD8. Ainda um outro aspecto preferido diz respeito a um anticorpo bi-específico, contendo uma região de ligação reactiva com o antigénio CD45 ou com uma isoforma deste (CD45R), da superfície do linfócito, para inibição da activação e função linfocitária.

Como se demonstra nos Exemplos posteriormente descritos, o anticorpo bi-específico CD3/CD4 apresenta capacidades

de sinal acrescidas para a activação de células T. Os anticorpos bi-específicos CD3/CD8, CD5/CD4 e CD5/CD8, também evidenciaram actividade reforçada para a mobilização do cálcio. Além disso, os anticorpos bi-específicos CD3/CD4, CD3/CD8 e CD3/CD2 induziram a proliferação das células T restantes, na presença de anticorpos anti-CD28.

Os heteroconjugados de anticorpos bi-específicos da presente invenção são úteis na regulação dos linfócitos *in vitro* ou *in vivo* e, por isso, podem utilizar-se para regular as respostas imunológicas celulares em situações de doença tais como doenças infecciosas, carcinomas, SIDA e distúrbios de auto-imunidade. Estes heteroconjugados e anticorpos bi-específicos podem ser especialmente úteis na regulação das respostas imunológicas das células em situações de doença em que existe deficiência ou um descontrolo das células T.

Foi demonstrado, por exemplo, que as isoformas de CD45 se expressam anormalmente em determinadas doenças de auto-imunidade [Rose et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 82:72389-7393 (1985)]. No entanto, os heteroconjugados ou os anticorpos bi-específicos, da presente invenção, contendo, pelo menos, uma molécula ou uma região reactiva com o receptor de CD45 ou com as isoformas CD45, pode ser útil na regulação da função dos linfócitos nas doenças de auto-imunidade.

Além disso, os heteroconjugados e anticorpos bi-es-

pecíficos da presente invenção podem ser úteis para intensificar a reacção imunológica em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). Sabe-se que o antigénio CD4 serve como receptor para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) que é responsável pela SIDA. Crê-se que CD4 é o receptor, ao qual se liga a glicoproteína de envólucro gp120 do HIV, durante a infecção das células T pelo vírus [ver, por exemplo, L.A. Lasky et al., Cell, 50:975 (1987) e M. Kowalski et al., Science, 237:1351 (1987)]. Após a infecção por HIV, a expressão de CD4 na superfície celular desce e os níveis de mRNA de CD4 decrescem [ver J.A. Hoxie et al., "Alterations in T4 (CD4) Protein And mRNA Synthesis In Cells Infected With HIV", Science, 234:1123-1127 (1986)]. Também está perfeitamente estabelecido que os pacientes com SIDA manifestam uma reacção imunológica reduzida aos antigénios solúveis [ver, por exemplo, H.C. Lane et al., "Qualitative Analysis Of Immune Function In Patients With The Acquired Immunodeficiency Syndrome", New Eng. J. Med., 313 (No 2): :79-84 (1985)]. Estudos in vitro, demonstraram que a gp120 de HIV purificada, pode inibir a reacção das células T à estimulação mitogénica, um resultado semelhante ao efeito observado quando se utilizaram anticorpos monoclonais solúvel para CD4, [ver, D.L. Nann et al., "HTLV-III Large Envelope Protein (gp120) Suppress PHA-Induced Lymphocyte Blastogenesis", J. Immunol., 138:2640-2644 (1987)].

Deste modo, pode pôr-se a hipótese de que a imunossupressão observada nos pacientes com SIDA possa estar rela-

cionada com o efeito da infecção de HIV na expressão do antígeno CD4, isto é, a descida da regulação de CD4 nas células T, que surge após a infecção por HIV, pode afectar a reacção imunológica por diminuição da capacidade de sinalização da célula, levando a um decréscimo na activação da célula T como resposta ao antígeno. Como fundamento para este modelo, descobriu-se que os acréscimos na concentração de cálcio livre estimulados por CD3 se encontram enfraquecidos nas células infectadas por HIV [G.P. Linette et al., "HIV-I Infected T Cells Exhibit A Selective Transmembrane Signalling Defect Through The CD3/Antigen Receptor Pahtway" Science, 241:573-576 (1988)]. Estas observações sugerem que os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos, da presente invenção, particularmente um heteroconjugado CD3/CD4 ou um anticorpo bi-específico, podem ser úteis no estudo ou tratamento das disfunções das células T que resultam da infecção por HIV.

Podem utilizar-se os heteroconjugados ou os anticorpos bi-específicos para a activação in vitro das células T. Pode obter-se esta activação fazendo contactar os linfócitos T extraídos de um paciente com, pelo menos, um dos heteroconjugados ou anticorpos bi-específicos da presente invenção, in vitro

pelo que as células T se tornam activas e podem depois ser reperfundidas no dador autólogo [ver, por exemplo, Rosenberg, et al., "Immunotherapy Of Cancer By Systemic Administration of Lymphoid Cells Plus Interleukin 2", J. Biol. Resp. Modif., 3:5501-5511 (1984)]. Este método de tratamento pode envolver a incubação conjunta ou a incubação prévia, in vitro, de células T com outros imunomoduladores.

De acordo com um aspecto alternativo, podem utilizar-se os heteroconjugados ou anticorpos bi-específicos para activar as células T, in vivo, injectando estes no paciente possivelmente em conjunção com outros agentes tais como a interleucina-2 (IL-2), factores do crescimento ou anticorpos agonistas tais como CD5 [ver, por exemplo, E.A Clark et al., "Amplification Of The Immune Response By Agonistic Antibodies", Immunology Today, 7:267-270 (1986)] e CD28 (ver Exemplo 1, adiante). Independentemente do método de tratamento, pode ser útil utilizar heteroconjugados que compreendam fragmentos de anticorpos tais como Fab ou F(ab')₂, anticorpos quiméricos ou anticorpos bi-específicos da presente invenção, que podem ser preferidos para a administrar in vivo porque são menores e/ou porque não têm domínios de ligação Fc funcionais e não são, portanto, facilmente removidos do organismo pelo sistema reticuloendoteleal (RES), como os heteroconjugados intactos. Os heteroconjugados ou anticorpos bi-específicos da presente invenção, podem administrar-se de forma convencional de administração que inclui, mas não se limita a administração intravenosa, oral,

subcutânea, intraperitoneal ou intralinfática. Dá-se preferência à administração intravenosa.

As composições farmacêuticas da presente invenção que compreendem os heteroconjugados ou os anticorpos bi-específicos podem apresentar-se numa gama de formas de dosagem que incluem mas não se limitam a formas de dosagem sólidas, semi-sólidas e líquidas tais como comprimidos, pílulas, pós, soluções ou suspensões líquidas, supositórios, microcápsulas ou microvesículas poliméricas, lipossomas e soluções injectáveis ou para infusão. A forma preferida depende do modo de administração e da aplicação terapêutica.

As composições de heteroconjugados ou de anticorpos bi-específicos podem incluir veículos convencionais aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico, conhecidos na especialidade, tais como proteínas do soro, por exemplo albumina do soro humano, substâncias tampão, como os fosfatos, água, sais ou electrólitos.

O modo mais eficaz de regime de dosagem e de administração, para as composições de heteroconjugados da presente invenção, depende da gravidade e do curso da doença, da saúde do paciente, da sua reacção ao tratamento e da opinião do médico assistente. De acordo com tudo isto, as dosagens dos heteroconjugados ou dos anticorpos bi-específicos devem ser estabelecidas individualmente. Contudo, uma dose eficaz do heterocon

jugado da presente invenção deverá situar-se no intervalo compreendido entre cerca de 1 e cerca de 100 mg/m². Para o tratamento in vitro, das células T, podem utilizar-se uma dose de cerca de 200 µg a 2 mg de heteroconjugado/10⁹ células.

Além disso, os heteroconjugados e os anticorpos bi-específicos da presente invenção podem utilizar-se em diagnóstico para medir a função receptora dum dado antigénio da superfície da célula T, por exemplo, o antigénio CD, em pacientes com doenças que envolvam um defeito ou descontrolo das células T. Utilizando um ensaio de cálcio, conforme anteriormente descrito para se medir a transdução do sinal (ver Exemplo 1), e controlos adequados, pode-se medir um defeito na função de CD comparando a activação, por intermédio de um heteroconjugado específico ou anticorpo bi-específico da presente invenção, das células T de um doador normal com a de um doador portador da doença. Por exemplo, o heteroconjugado CD3/CD4, da presente invenção, aumenta a mobilização de $[Ca^{2+}]_i$, a concentrações proteicas abaixo das observadas com apenas anti-CD3 solúvel. Deste modo, a estas doses baixas, mede-se efectivamente a função do receptor CD4. Isto reflecte-se na capacidade do anti-CD4 solúvel para bloquear a actividade do heteroconjugado CD3/CD4 a estas doses (ver Figura 2). De modo semelhante, com o heteroconjugado CD3/CD8 a baixas doses, é possível medir-se a função do receptor CD8. Portanto, a estas doses baixas, pode utilizar-se um heteroconjugado ou anticorpo bi-específico para detectar defeitos numa função particular do receptor CD em diversas si-

tuações de doença, tais como carcinomas e doenças de auto-imunidade. Em alternativa, os doseamentos de cálcio podem processar-se a qualquer dose com qualquer heteroconjugado ou anticorpo bi-específico, da presente invenção, desde que se efectuem os controlos dos anticorpos simples adequados, isto é, tem de comparar-se, a actividade do heteroconjugado ou do anticorpo bi-específico com a actividade dos anticorpos não conjugados que constituem os componentes daquele heteroconjugado ou anticorpo bi-específico (ver, por exemplo, o pedido de patente de invenção europeia nº 221 768 de E.L. Reinherz et al., publicado em 13 de Maio de 1987).

No sentido de tornar mais compreensível a invenção aqui descrita fornecem-se os exemplos seguintes. Deverá ter-se em conta que os exemplos se destinam a fins unicamente ilustrativos e não devem limitar, de modo algum, o âmbito da presente invenção.

EXEMPLO 1

O exemplo que se segue descreve a preparação e caracterização de um novo heteroconjugado da presente invenção. De acordo com este aspecto, procedeu-se à ligação cruzada de um anticorpo que reage com CD3, com um anticorpo que reage com CD4 para formar um novo heteroconjugado CD3/CD4 que origina um aumento na sinalização da transmembrana na activação das células T CD4⁺ (isto é, células auxiliares) tratadas com o heteroconjugado.

Preparação de um Heteroconjugado CD3/CD4 da Presente Invenção

Os anticorpos CD3 e CD4 que se utilizaram para formar o heteroconjugado deste aspecto, foram G19-4 (Balb/c, IgG₁) e G17-2 (Balb/c, IgG₁), respectivamente. Prepararam-se estes anticorpos conforme descrito por J.A. Ledbetter e E. Clark, "Surface Phenotype And Function Of Tonsillar Germinal Center And Mantle Zone B Cell Sub-Sets", Human Immunology, 15:30-43 (1986) e J.A. Ledbetter et al., "An Immunoglobulin Light Chain Dimer With CD4 Antigen Specificity" Molecular Immunology, 24 (Nº 12): :1255-1261 (1987). Além disso, outros anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 que se podem utilizar para construir o heteroconjugado deste aspecto encontram-se comercialmente disponíveis (por exemplo, T3, Coulter Co. Fl e Leu-3, Becton Dickinson, CA, respectivamente). Purificaram-se os anticorpos G19-4 e G17-2 a partir de fluído ascítico por precipitação salina e cromatografia DEAE, seguida de diálise e filtração através de filtros de 0,45 μ antes de se utilizarem.

Conjugaram-se os dois anticorpos monoclonais numa proporção molar de 1:1 com o reagente de ligação cruzada heterobifuncional, GMBS (Calbiochem, La Jolla, CA) e 5-iminotiolano HCl (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) conforme descrito para o acoplamento da ficoeritrina, segundo R.R. Hardy, supra. Separou-se o heteroconjugado resultante dos anticorpos livres por cromatografia de exclusão FPLC, em Superose 6 (Pharmacia, Uppsala, Suécia) e efectuou-se um ensaio de reactividade com CD3 e CD4

ensaiando a capacidade do heteroconjugado para bloquear a ligação dos anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 directamente conjugados com fluoresceína. Este heteroconjugado CD3/CD4 denominou-se G19-4/g17-2.

Aumento da Mobilização do Cálcio pelo Heteroconjugado CD3/CD4 da Presente Invenção

Ensaiou-se, então, o heteroconjugado G19-4/G17-2 quanto à sua capacidade para aumentar a mobilização do cálcio citoplásmico nas células, comparando-a com a actividade de G19-4 (anti-CD3) sozinho. As células utilizadas foram linfócitos do sangue periférico humano purificadas a partir do sangue periférico por centrifugação num FicollHypaque, seguida de aderência a plástico para remover a maioria dos monócitos.

Mediu-se o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ no interior das células utilizando indo-1 (Molecular Probes, Eugene, OR) e um citómetro de fluxo, modelo 50 HH/2150 (Ortho Diagnostic Systems, Inc. Westwood, MA) conforme anteriormente descrito por P.S. Rabinovitch et al., "Heterogeneity Among T Cells In Intracellular Free Calcium Responses After Mitogen Stimulation With PHA or Anti-CD3, Simultaneous Use Of Indo-1 And Immunofluorescence With Flow Cytometry", J. Immunol, 137 (Nº 3): 952-961 (1986), que aqui se indica como referência. Resumidamente, carregam-se as células (5×10^7 /ml) com Indo-1 por incubação com o seu éster acetoxi-metílico (Molecular Probes, Junction City, OR) o qual

é permeável através da membrana celular e é hidrolisado no citoplasma na sua forma impermeável. A incubação efectuou-se durante 45 minutos a 37°C em meio contendo a concentração indicada de indo-1. Depois, lavaram-se as células e efectuou-se nova suspensão das mesmas em meio recentemente preparado a $2,5 \times 10^6$ /ml e armazenou-se ao abrigo da luz, à temperatura ambiente até se analisar. Para cada um dos ensaios diluíram-se as células carregadas com indo-1 para 1×10^6 /ml com meio e equilibraram-se a 37°C. As medidas efectuaram-se utilizando espectrofluorimetria e citometria de fluxo conforme descrito por Rabinovitch, supra. Analisaram-se os histogramas mediante programas que calcularam a relação média violeta de indo-1/fluorescência azul em função do tempo. Para além disso, a percentagem de células que reagiram em função do tempo analisou-se por intermédio de programas que determinaram em primeiro lugar o valor da proporção de indo-1 que foi de duas vezes o desvio padrão em relação à proporção das células de controlo e, depois, travou-se o diagrama da percentagem de células acima deste valor inicial em função do tempo. Em todas as indicações de citometria de fluxo, existem 100 indicações marcadas por pontos sobre o eixo dos X (tempo).

Conforme se indica na Figura 1, a concentração de G19-4/G17-2 necessária para aumentar a concentração de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) foi 1,5 a 2 vezes inferior à concentração necessária quando se utiliza apenas G19-4. Para além disso, a actividade do heteroconjugado G19-4/G17-2 limitou-se às, células

T CD4⁺, uma vez que o enriquecimento das células CD4⁺ por imunofluorescência originou um aumento correspondente na actividade de de $[Ca^{2+}]_i$ e na percentagem das células que reagem. Assim, como a Figura 2 demonstra, quando se estimulam os linfócitos do sangue periférico com o heteroconjugado G19-4/G17-2, a reacção máxima média de $[Ca^{2+}]_i$, às células foi de aproximadamente de 1 300 nM e reagiram aproximadamente 60% das células. Contudo, quando se analisou apenas a sub-população de células CD4⁺, a resposta média máxima de $[Ca^{2+}]_i$ foi >10 000 nM e >95% das células reagiram. Para além disso, a actividade do heteroconjugado nas células CD4⁺ foi inibida quase completamente por tratamento prévio das células durante menos de 5 minutos com 5 µg/ml de G17-2 (anti-CD4), seguida de 0,4 µg/ml do heteroconjugado.

Analisaram-se as células CD4⁺ retendo as células negativas para CD8, CD11, CD16 e para CD20, conforme se indica no painel inserido na Figura 2. Efectuou-se esta selecção negativa de células CD4⁺ por coloração dos linfócitos do sangue periférico com 2H7 conjugado com ficoeritrina (PE), um anticorpo monoclonal que reage com CD20, [ver, por exemplo, E.A. Clark et al., "Role Of The Bp35 Cell Surface Polypeptide In The Human B-Cell Activation", Proc.Nat'l. Acad. Sci. USA, 82:1766-1770 (1985)], FC-2 um anticorpo monoclonal para CD16 [ver, por exemplo, C. Anasetti et al., "Induction Of Calcium Flux And Enhancement Of Cytolytic Activity In Natural Killer Cells By Cross-Linking Of The Sheep Erythrocyte Binding Protein (CD2) And The Fc-Receptor (CD16)", J.Immunol., 139 (Nº6): 1722-1779 (1987)], G10-1, um anticorpo monoclonal para CD8 [ver, por exemplo, J. A. Ledbetter et al., "Covalent Association Between Human

Thymus Leukemia - Like Antigens And CD8 Molecules", J. Immunol., 134:4250-4254 (1985)] e 60.1, um anticorpo monoclonal que reage com CD11] ver, por exemplo, J.P. Bunyon et al., "Diferential Participation Of Epitopes On Alpha And Beta Chains Of The LFA Family Neutrophil Aggregations As Defined By Workshop Monoclonal Antibodies", in Leukocyte Typing III, supra pp. 844-47)], e retendo as células não tingidas que foram > 95% de células CD4 positivas.

As titulações comparativas de G19-4 em função do heteroconjugado G19-4/G17-2 também se levaram a efeito na presença de EGTA 5 mM (ácido etilenoglicol-bis(éter 8-amino-etílico)-N,N,N',N'-tetraacético, que forma quelatos, removendo, assim, o cálcio extracelular para se verificar se foi a mobilização de cálcio a partir de fontes citoplasmáticas que foi afectada pelo heteroconjugado. A Figura 3 mostra que houve um aumento de aproximadamente 2 unidades logarítmicas na capacidade de mobilizar o cálcio com o heteroconjugado G19-4/G17-2 na presença de EGTA. Na presença de cálcio extracelular, as titulações até ao ponto final indicaram um acréscimo de aproximadamente 2 unidades logarítmicas na actividade (não se apresentam os dados).

No sentido de se poder excluir que a valência da ligação dos antigénios CD3 ou de CD4 fosse responsável pelos efeitos do heteroconjugado CD3/CD4 no [Ca²⁺]i, construíram-se os homoconjugados CD3/CD3 e CD4/CD4 para se fazer a comparaa

ção com o heteroconjugado CD3/CD4. Construíram-se os homoconjugados consoante anteriormente referido para o heteroconjugado CD3/CD4 e designaram-se por G19-4/G19-4 e G17-2/G17-2, respectivamente. Conforme se apresenta no Quadro 1, adiante, nem o homoconjugado CD3/CD3 nem a mistura dos homoconjugados CD3/CD3 mais CD4/CD4 simularam os efeitos intensificados do heteroconjugado CD3/CD4 no $[Ca^{2+}]_i$. Estes dados sugerem que a actividade intensificada do heteroconjugado CD3/CD4 não é uma função da valência do heteroconjugado e, portanto, resulta presumivelmente, da proximidade física das moléculas de CD3 e de CD4 que ocorre através da interacção destes antigénios com o heteroconjugado. Além disso, os heteroconjugados e os homoconjugados foram ligeiramente menos activos que os anticorpos livres em ensaios de ligação utilizando a coloração indirecta e citometria de fluxo (não se apresentam os dados). Assim, é pouco provável que a actividade única do heteroconjugado CD3/CD4 esteja relacionada com um efeito na afinidade de ligação de CD3 para a qual contribui a segunda especificidade do heteroconjugado.

QUADRO I

Reacção de $[Ca^{2+}]_i$ das células T CD4⁺ ao Heteroconjugado CD3/CD4 em função dos Homoconjugados CD3/CD3 e CD4/CD4*

<u>Estimulação</u>	<u>Concentração μg/ml</u>	<u>Máxima, Média $[Ca^{2+}]_i$ (nM)</u>	<u>Aumento acima do basal</u>
Nenhum	--	130	1,0
Heteroconjugado CD3/CD4	10	15 600	120
	2	10 900	83
	0,4	4 140	32
	0,08	810	6,2
Homoconjugado CD3/CD3	50	2 360	18
	10	559	4,3
	2	301	2,3
Homoconjugado CD4/CD4	100	130	1,0
	50	130	1,0
Homoconjugado CD3/CD3	25+25	590	4,5
	5+5	272	2,1
Homoconjugado CD4/CD4 ⁺	1+1	251	1,93

Nos ensaios da reacção de $[Ca^{2+}]_i$ utilizou-se linfócitos do sangue periférico impregnados com indo-1 e corados com anti-CD20, anti-CD8 e anti-CD16 conjugados com PE, conforme anteriormente descrito. Analisaram-se as células que não coraram e constituíram $>95\%$ das células CD4⁺. A resposta máxima média ocorreu nos primeiros cinco minutos após a estimulação.

Efeito na Síntese do Fosfato de Inositol Originado pelo Heteroconjugado CD3/CD4 da Presente Invenção

Devido ao facto de se pensar que a mobilização do cálcio citoplásmico nas células T é mediada pela criação de trifosfato de inositol (InsP₃), mediu-se o aumento nos fosfatos de inositol após estimulação das células T CD4 purificadas, apenas com o anticorpo monoclonal para CD3 ou com o heteroconjugado CD3/CD4.

Purificaram-se as células T CD4⁺, de acordo com o descrito por C.H. June et al., "T-Cell Proliferation Involving The CD28 Pathway Is Associated With Cyclosporine-Resistant Interleukin 2 Gene Expression", Mol. Cell. Biol., 7 (Nº12):4472-4481 (1987). De um modo resumido, obtiveram-se os linfócitos do sangue periférico por leucoforese do pessoal do laboratório, seguida de centrifugação de gradiente de densidade Ficoll/Hypaque. Depois, isolou-se a sub-população CD4⁺ de células T, por selecção negativa com imuno-absorção de gotas magnéticas, depois de se ter coberto, em primeiro lugar, as células CD8⁺, CD11⁺, CD16⁺, CD14⁺ e CD20⁺ com quantidades saturadas do anticorpo monoclonal adequado fez-se referência, anteriomente, à maioria dos anticorpos, com excepção do anticorpo monoclonal anti-CD14, 20.3, preparado conforme descrito por M, Kamoun et al., "Human Monocyte-Hystiocyte Differentiation Antigens Identified By Monoclonal Antibodies", Clin, Immunology and Immunopathology, 29:181-195 (1983). Esta estratégia tirou

partido da distribuição recíproca e não sobreposta dos antígenos CD4 e CD8, de superfície, nos restantes linfócitos T do sangue periférico. Lavaram-se as células três vezes para se removerem os anticorpos que não se ligaram e depois incubaram-se com partículas magnéticas cobertas com imunoglobulina anti-murina de caprino (Advanced Magnetics Institut, Cambridge, MA) e removeram-se as células cobertas pelas gotas por separação magnética. Tipicamente, recuperaram-se 500×10^6 células T CD4⁺, aproximadamente, o que foi $>98\%$ de CD4⁺, conforme se determinou por citometria de fluxo e continham $<0,1\%$ de monócitos conforme se determinou por coloração por esterase não específica.

Efectuou-se, então uma nova suspensão de células T CD4⁺ purificadas, a $2-4 \times 10^6$ células/ml em RPMI 1640 enriquecido com soro de feto de bovino inactivado pelo calor, a 10% ("meio") enriquecido com 4 $\mu\text{g/ml}$ de PHA e 49 $\mu\text{Ci/ml}$ de myo-2 [³H] γ -inositol (37 MBq/ml; Amersham Corp. Arlington Heights, IL) e incubou-se a 37°C com 5% de CO₂ no ar. Decorridas 72 horas, lavaram-se as células três vezes e voltou a efectuar-se uma nova suspensão a 5×10^6 células/ml em "meio"enriquecido com LiCl 10 mM. Após 20 minutos de incubação, adicionaram-se o heteroconjugado G19-4/G17-2 a t=0, a uma concentração final de 1 $\mu\text{g/ml}$. Depois, a tempos diferentes, retiraram-se amostras de 6×10^5 células que sedimentaram durante 10 segundos numa centrífugadora Eppendorf 5414. Depois de se ter efectuado a aspiração do meio, adicionou-se 1 ml de TCA a 10% (p/v) arrefecido em gelo, ao agregado celular. Após remoção do material insolúvel por centrifugação a 900xg, durante 5 minutos, extraiu-se

o sobrenadante com 6 volumes de éter dietílico e depois neutralizou-se. Separaram-se os fosfatos de $[^3\text{H}]\text{-inositol}$ por cromatografia de permuta de aniões utilizando Dowex 1-X8 formatado (malha 100-200) (Bio-Rad, Richmond, CA) e quantificou-se por espectroscopia de cintilação líquida num Bio-Safe 2 (Research Products, Int, Mt. Prospect, Il). Este procedimento para se medir o fosfato de inositol tritiado foi descrito por J.B. Imboden et al., "Transmembrane Signalling By The Cell Antigen Receptor", supra e J.B. Imboden e outros, "Antigen Recognition By A Human T Cell Clone Leads To Increases In Inositol Trisphosphate", supra.

A Figura 4 demonstra que, a 1 $\mu\text{g/ml}$, o heteroconjugado estimulou um acréscimo substancial na formação dos mono-, di- e tri-fosfatos de inositol enquanto o G19-4 sozinho, apenas originou um pequeno aumento no mono-fosfato de inositol. Também se apresentam os níveis de fosfatos de inositol tritiado nas células não estimuladas, no início ($t=0$) e no fim da experiência ($t=10$ minutos).

Em experiências adicionais que se indicam na figura 5, observou-se que os anticorpos monoclonais livres para CD4, G17-2, inibiam a reacção do fosfato de inositol originada pelo heteroconjugado. G17-2 não inibiu a resposta do fosfato de inositol ao anticorpo monoclonal livre anti-CD3, G19-4. De acordo com estas experiências, incubaram-se as células T CD4^+ , durante 72 horas em meio contendo $[^3\text{H}]\text{-inositol}$ (40 $\mu\text{Ci/ml}$) e

PHA (4 $\mu\text{g/ml}$), lavaram-se extensivamente e depois efectuou-se nova suspensão em meio com LiCl 10 mM, e incubaram-se durante 20 minutos a 37°C. Depois, adicionou-se G17-2 (conjugado com biotina, conforme descrito por J.W. Goding, in Monoclonal Antibodies Principles And Practices, p. 230, Academic Press (1983), para se seleccionarem as amostras. Decorridos 5 minutos, adicionou-se G19-4, G17-2, heteroconjugado G19-4/G17-2 e avidina, conforme indicado, e prolongou-se a incubação durante mais 10 minutos, A seguir à lise das amostras celulares (10^7 células/amostra) em TCA a 10%, extraíram-se os fosfatos de [^3H]-inositol, separaram-se por cromatografia de permuta de aniões e quantificaram-se conforme se descreveu antes. Na Figura 5 apresentam-se duas experiências independentes. Apresenta-se a média +/- sem (desvio-padrão) para as amostras celulares em triplicado e também se apresenta na Figura a concentração final em $\mu\text{g/ml}$ do anticorpo monoclonal e de avidina.

Deste modo, os dados experimentais demonstram não só o efeito amplificador do heteroconjugado da presente invenção na produção de fosfato de inositol mas também que o anticorpo solúvel, para CD4, inibe esta resposta das células T. Os dados sugerem, além disso, a importante função desempenhada pelo antigénio CD4 na estimulação das respostas das células T.

O Heteroconjugado CD3/CD4 Possui Uma Nova Actividade Na Activação Das Células T

Descobriu-se que o heteroconjugado CD3/CD4, da presente invenção, possui uma nova actividade funcional na activação das células T conforme se demonstrou em ensaios de proliferação utilizando os homoconjugados CD3/CD3 e CD4/CD4 como controlos. Nestes ensaios, efectuou-se a cultura de células T CD4⁺, em amostras quaduplicadas, em placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano, a 5×10^4 células por cavidade em meio RPMI 1640, contendo soro de feto de bovino inactivado pelo calor a 5% (Hyclone, Logan, UT). Cultivaram-se as células CD4⁺ durante 3 dias com G19-4 (anti-CD3), G19-4/G19-4 (homoconjugado CD3/CD3), G19-4/G17-2 (heteroconjugado CD3/CD4) ou com G17-2/G17-2 (homoconjugado CD4/CD4) com ou sem PMA (acetato miristato de forbólico) (1 µg/ml) ou com o anticorpo monoclonal 9,3, um anticorpo que reage com o antígeno CD28 na superfície das células T. (Balb/c X C57BL/6)FI, IgG_{2a}) [ver, por exemplo, J.A. Hansen et al., "Monoclonal Antibodies Identifying a Novel T Cell Antigen And Ia Antigens Of Human Lymphocytes", Immunogenetics 10:247-52 (1980)]. Utilizaram-se todos os anticorpos e conjugados a 1 µg/ml.

Determinou-se a incorporação de timidina (cpm média \pm sem) no terceiro dia num contador de cintilações líquidas, após pulsação das células durante as últimas 8 horas de culturas de três dias com [³H]-timidina (New England Nuclear Corp.,

Boston, MA).

Conforme se indica na Figura 6, quando se efectuam culturas de células T CD4⁺ ou com apenas os reagentes anti-CD3 ou apenas com PMA, não se observou proliferação. Na presença de PMA, todas as preparações de anticorpos contendo o anticorpo monoclonal para CD3 induziram níveis comparáveis de incorporação de ³H-timidina, ao passo que o homoconjugado para CD4 não se revelou mitogénico. O mAb CD28 estabiliza mRNAs de citocina induzidos que são requeridos para induzir a proliferação.

[Lindesten et al., Science 244:339-343, (1989)]. Quando se ensaiaram os diversos reagentes quanto ao seu efeito sinérgico com o anticorpo monoclonal para CD28, 9,3, observaram-se, contudo, diferenças substanciais. Apenas o heteroconjugado CD3/CD4 induziu capacidade de resposta no anticorpo para CD28. Estudos anteriores demonstraram que a estimulação de CD28 não é mitogénica para as células T purificadas, embora o anticorpo monoclonal para CD28 origina a progressão de mais de 95% das células T no ciclo celular, na presença de PMA (ver, por exemplo, C.H. June et al., Mol. Cell. Biol., supra). A descoberta actual de que a estimulação por CD28 das células T purificadas não é concomitantemente mitogénica com os anticorpos para CD3 de fase líquida confirma os estudos anteriores [ver, por exemplo, A. Weiss, Synergy Between The T3/Antigen Receptor Complex And Tp44 In The Activation Of Human T Cells", J. Immunol., 137 (Nº3): :819-825 (1986)].

Com o objectivo de se determinar se a diferença entre o heteroconjugado CD3/CD4 e o homoconjugado CD3/CD3, no que se refere à estimulação de CD28, foi qualitativa ou quantitativa, efectuou-se uma cultura de células T CD4⁺, com G19-4, com o heteroconjugado G19-4/G17-2 ou com o homoconjugado G19-4/G19-4 a diversas concentrações, com PMA (1 µg/ml) ou com o anticorpo monoclonal anti-CD28, 9,3, (1 µg/ml). Conforme se indica na Figura 7, descobriu-se que o heteroconjugado G19-4/G17-2 era totalmente mitogénico em concomitância com a estimulação originada por CD28 mesmo a concentrações tão baixas como 100 ng/ml, enquanto o homoconjugado CD3/CD3 não se mostrou mitogénico a 10 µg/ml. Em contrapartida a resposta comitogénica das células à estimulação por PMA e CD3 foi semelhante à dos conjugados do anticorpo CD3 em todas as concentrações ensaiadas. Para além disso, experiências de efeitos cinéticos revelaram que a diferença entre o homoconjugado CD3/CD3 e o heteroconjugado CD3/CD4 no que respeita à estimulação de CD28 não se deve a uma deslocação ao longo do tempo de proliferação (não se apresentam os dados).

Deste modo, parece que as células T CD4⁺ que não reagem, mediante proliferação, ao anticorpo solúvel reactivo com CD3, respondem ao heteroconjugado CD3/CD4 da presente invenção, proliferando na presença do anticorpo CD28.

Para estudar melhor os efeitos do heteroconjugado CD3/CD4 na proliferação das células T, determinou-se a cinética

do ciclo celular, por intermédio de uma técnica que permite a distinção das células em cada uma das fases de três ciclos se quenciais celulares, após estimulação. Separaram-se as células T CD4⁺ por citometria de fluxo, num separador celular Cytofluorograph 50 HH (Ortho Diagnostic Systems, Inc., Westwood; MA), depois de se terem corado as células com os anticorpos CD8, CD16, e CD20 (anteriormente referidos) conjugados com PE. Sepa raram-se as células negativas das quais 97% foram CD4 positivas na reanálise da população separada. Para além do parâmetro de imunofluorescência, mediu-se o avanço da dispersão (scattering) e a dispersão em ângulo recto e utilizou-se para reter a populaçãõ de linfócitos e excluir os monócitos, detritos e células mor tas. Separaram-se as células com um caudal de 2 000 células/se-gundo a 20°C.

Efectuaram-se culturas quaduplicadas das células separadas, em placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo redondo (Nunc, Kampstrip, Dinamarca) a 5×10^4 células/cavidade. Adicionou-se o heteroconjugado G19-4/G17-2 ou os homoconjugados de CD3 ou CD4, às culturas a 5 µg/ml ou adicionou-se PHA a 10 µg/ml. Desenvolveram-se as células em RPMI 1640 enriquecido com 10% FBS na presença de 0,6 µg/ml do anticorpo monoclonal anti-CD28, 9,3, $1,5 \times 10^{-4}$ MBrdU, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e 2-mercapto-etanol a 5×10^{-5} M. Após três dias de incubação a 37°C (5% de CO₂), aspirou-se cuidadosamente o meio das cavidades e substituiu-se por 0,2 ml de uma solução co rante contendo Tris 0,1 M, a pH 7,4, NaCl a 0,9%, CaCl₂ 1 mM,

MgCl₂ 1,0 mM, BSA a 0,2%, NP40 a 0,1% e 1 µg/ml de Hoechst 33258 (Sigma) e 5 µg/ml de brometo de etídio, EB (Calbiochem). Incubaram-se as células durante 30 minutos a 4°C, voltou a efectuar-se uma suspensão das mesmas e efectuou-se a citometria de fluxo num ICP-22 (Ortho Diagnostic Systems, Inc.) interligado com um computador PDP11/03 (Digital Equipment, Maynard, MA), conforme anteriormente descrito por P.S. Rabinovitch, "Detection Of An Unusually Stable Fibrinolytic Inhibitor Produced By Bovine Endothelial Cells", Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 80:2956-60 (1983). Utilizou-se a excitação ultra-violeta (filtro UG1), tendo-se detectado a emissão com Hoechst 33258, entre 425 e 500 nm e a fluorescência acima de 600 nm. Analisou-se a fluorescência de aproximadamente 3-4 x 10³ células e registou-se como um histograma de variação dupla de Hoechst em função da fluorescência de EB. A determinação das dimensões individuais das fases do ciclo celular efectuou-se por análise e teste de curva, conforme anteriormente descrito por P. S. Rabinovitch, id.

A Figura 8 indica a percentagem de células passados o primeiro, segundo e terceiro ciclos celulares. Como a Figura demonstra, apenas o heteroconjugado CD3/CD4 foi capaz de conduzir significativamente as células através do ciclo celular, pelo que 45% das células entraram na fase S ou na sua vizinhança e 39% das células entraram num segundo ciclo de proliferação após três dias de estimulação com o heteroconjugado. Deste modo, a incorporação de ³H-timidina pelas células CD4⁺ puri-

ficadas em resposta ao heteroconjugado CD3/CD4 mais a estimulação de anti-CD28 (conforme se indica nas Figuras 6 e 7) representa uma resposta proliferativa substancial que persistiu na segunda e na terceira gerações. Em contrapartida, nenhuma outra preparação de anticorpos induziu transição significativa do ciclo celular (ver Figura 8). A Figura 8 também indica que, em comparação com PHA mais o controlo anti-CD4, em que 70% das células seleccionadas entraram na fase S, após três dias de cultura, reagiram 45% das células estimuladas com o heteroconjugado CD3/CD4. Isto indica que um número significativo de células CD4⁺ apresenta progressão do seu ciclo celular após estimulação com o heteroconjugado CD3/CD4.

O Heteroconjugado CD3/CD4 Modula Simultaneamente Os Antígenos CD3 e CD4 Das Células T

Mediu-se a modulação dos Antígenos CD3 e CD4 na superfície das células T, por intermédio do heteroconjugado CD3/CD4, dos homoconjugados CD3 ou CD4 ou apenas com o anticorpo para CD4 ou para CD3, determinando a densidade do anticorpo ou dos anticorpos conjugados na superfície das células T CD4⁺, após 18 horas de incubação a 37°C, na presença de 10 µg/ml de anticorpo ou anticorpo conjugado, utilizando imunofluorescência com uma IgG anti-murina, num segundo passo, e efectuando a medição num citómetro de fluxo FACS IV. Apresentam-se resultados no Quadro II, seguinte, em que a densidade se encontra expressa em unidades de intensidade de fluorescência médias, acima da base, medida numa escala linear.

QUADRO II

Modulação Efectuada Pelos Conjugados

<u>Especificidade</u>	<u>Densidade Super_</u> <u>ficial Anterior</u> <u>à Modulação</u>	<u>Densidade Super_</u> <u>ficial Posterior</u> <u>à Modulação</u>	<u>Perce-</u> <u>tagem de</u> <u>Modulação</u>
CD4	150	48	68
Homoconjugado CD4/CD4	226	75	67
CD3	177	9	95
Homoconjugado CD3/CD3	340	10	99
Heteroconjugado CD3/CD4	369	19	95

Como o Quadro Indica, a incubação durante a noite com o anticorpo CD3 ou com o homoconjugado CD3/CD3 originou uma expressão superficial de CD3 quase indetectável, enquanto permaneceram, ainda, quantidades significativas de CD4 de superfície após incubação semelhante com o anticorpo CD4 ou com o homoconjugado CD4/CD4. Contudo, o heteroconjugado CD3/CD4 provocou a modulação tanto de CD3 como de CD4 e parece diminuir a expressão superficial de CD4. Todos os anticorpos e conjugados utilizados nestes ensaios estavam em excesso, uma vez que não se detectaram antigénios CD3 ou CD4 livres na superfície celular após a modulação (isto é, não ligados por anticorpos) quando se ensaiou utilizando conjugados de fluorescência directa para

anti-CD3 ou anticorpos monoclonais anti-CD4 (não se apresentam os dados). Assim, o heteroconjugado CD3/CD4 da presente invenção, modula simultaneamente, os antigénios CD3 e CD4 na superfície das células T, o que indica que o heteroconjugado não fixa simplesmente o receptor da célula T à superfície celular, conforme se sugeriu no caso do anticorpo imobilizado para CD3 (ver, por exemplo, J.A. Ledbetter et al., J. Immunol., supra). Além disso, os estudos com o anti-CD3 solúvel indicaram que quando CD3 é modulado a partir da superfície celular, o receptor CD3/Ti interioriza-se [ver, por exemplo O.W. Press. et al., "Evaluation Of Ricin A Chain Immunotoxins Directed Against Human Cells", Cellular Immunol., 102:10-20 (1986) e O.W. Press et al., "Endocytosis And Degradation Of Murin Anti-Human CD3 Monoclonal Antibodies By Normal And Malignant T Lymphocytes", Cancer Research, 48:2249-2257 (1987)] conduzindo à inibição da activação das células T. Os heteroconjugados da presente invenção também conduzem à interiorização do receptor, mesmo quando a activação das células T está amplificada.

Como este exemplo demonstra, o heteroconjugado CD3/CD4, da presente invenção, aumenta a mobilização de Ca^{2+} e a produção de fosfato de inositol na activação das células T $CD4^+$. Além disso, o heteroconjugado possui uma nova actividade funcional na proliferação das células T $CD4^+$, na presença do anticorpo CD28, conduzindo uma fracção significativa de células para um segundo ciclo celular nos primeiros três dias de estimulação . Por outro lado o heteroconjugado parece modular si

multaneamente os antigénios com os quais reage, tornando consistente a hipótese de que este heteroconjugado actua promovendo uma estreita aproximação destes antigénios na activação das células T.

EXEMPLO 2

O exemplo que segue descreve a construção e a caracterização de outros heteroconjugados da presente invenção, constituídos por um anticorpo que reage com o antigénio CD3 em ligação cruzada a qualquer um de diversos outros anticorpos que reage com os antigénios CD das células T.

Os heteroconjugados de anticorpos, construídos de acordo com o Exemplo 1, anterior, foram: a) um heteroconjugado CD3/CD2 constituído por anticorpos monoclonais G19-4 (anti-CD3) (anteriormente referido) e 9,6 (anti-CD2), [ver, por exemplo, P.J. Martin et al., "Identification And Functional Characterization Of Two Distinct Epitopes On The Human T Cell Surface Protein Tp50", J.Immunol. 131:180 (1983)]; b) um heteroconjugado CD3/CD5 compreendendo os anticorpos monoclonais G19-4 e 10,2 (anti-CD5) [ver, por exemplo, Martin et al., "A New Human T-Cell Differentiation Antigen; Unexpected Expression On Chronic Lymphocytic Leukemic Cells", Immunogenetics, 11:429 (1980) e P.J. Martin et al., "Monoclonal Antibodies Recognizing Normal Human T

Lymphocytes And Malignant B Lymphocytes A Comparative Study", J. Immunol., 12:1920 (1981) *J*; c) um heteroconjugado CD3/CD6 compreendendo os anticorpos monoclonais G19-4 e G3-6 (anti-CD6) (G3-6 é um anticorpo monoclonal anti-CD6 do isotipo IgG₁ produzido por imunização de ratos Balb/c com a linha de células leucêmicas T, HSB2. Produziram-se os híbridos por fusão das células do baço de ratos com a linha NSI de mieloma e efectuou-se o rastreio, ligando células T normais e com bloqueio cruzado com anticorpo de preferência para CB6, 12,1 *ver*, por exemplo, P.J. Martin et al., J. Immunol., 127, supra *J*.; d) um heteroconjugado CD3/CD7 constituído pelos anticorpos monoclonais G19-4 e G3-7 (anti-CD7) (G3-7 é um anticorpo monoclonal anti-CD7 do isotipo IgG₁ produzido por imunização de ratos Balb/c com a linha de células T leucêmicas HSB2. Produziram-se os híbridos pela fusão das células do baço de ratos com a linha NSI de mieloma e efectuou-se o rastreio por ligação de células T normais e de bloqueio cruzado com o anticorpo de referência CD7, 3A₁, que se encontra disponível na American Type Culture Collection. Além disso, está comercializado um anticorpo monoclonal anti-CD7 (Betcon Dickinson, Mountanvien, CA *ver*, por exemplo, E.L. Reinherz et al., (eds.), Leukocyte Typing II, Vol. 1, pp. 3-30 (1986) *J*; e) um heteroconjugado CD3/CD8 compreendendo os anticorpos monoclonais G19/4 e g10-1 (anti-CD8) (anteriormente referido); e, f) um heteroconjugado CD3/CD28 constituído pelos anticorpos monoclonais G19-4 e 9,3 (anteriormente referido).

Testaram-se estes heteroconjugados quanto à sua capacidade para aumentar a mobilização do Ca^{2+} citoplásmico nas células T, conforme se descreveu no Exemplo 1. Ensaiou-se cada um dos heteroconjugados a $1 \mu\text{g/ml}$, uma concentração para a qual a actividade do anticorpo para CD3, sozinho, é quase óptima e em que se detecta o aumento de actividade dos conjugados. As respostas máximas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dos linfócitos do sangue periférico carregados com indo-1 ocorreram nos primeiros 5 minutos após estimulação das células com o heteroconjugado. As células não estimuladas apresentaram um $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 130 nM. Nas experiências com os heteroconjugados CD3/CD4 e CD3/CD8, mediu-se a actividade do conjugado nas sub-populações de células CD4^+ e CD8^+ , respectivamente. No Quadro III a seguir, apresenta-se a actividade destes conjugados na mobilização do cálcio.

QUADRO IIIActividade dos Heteroconjugados Anti-CD3 na Mobilização
do Cálcio

<u>Conjugados</u>	<u>Máximos de $[Ca^{2+}]$ (nM)</u>
CD3/CD3 (G19-4/G19-4)	186
CD3/CD2 (G19-4/9,6)	2722
CD3/CD4 (G19-4/G17-2)	3349
CD3/CD5 (G19-4/10,2)	155
CD3/CD6 (G19-4/G3-6)	836
CD3/CD7 (G19-4/G3-7)	276
CD3/CD8 (G19-4/G10-1)	2690
CD3/CD28 (G19-4/9,3)	204

Conforme o Quadro III indica, os heteroconjugados CD3/CD2, CD3/CD6, CD3/CD7 e CD3/CD8 (assim como o heteroconjugado CD3/CD4) originaram um acréscimo assinalável na mobilização do cálcio nas células T tratadas com aqueles heteroconjugados quando comparado com a actividade das células não estimuladas ou com as células estimuladas por CD3/CD3. Pensa-se que estes heteroconjugados, tal como o heteroconjugado CD3/CD4 descrito no Exemplo 1, actuem conduzindo os antigénios com os quais reagem para uma estreita

proximidade, originando um sinal de transmembrana aumentado e activação de células T aumentada.

EXEMPLO III

Neste Exemplo descreve-se a construção e caracterização de outros heteroconjugados da presente invenção constituídos por um anticorpo que reage com um antigénio da superfície das células T CD5 com ligação cruzada a qualquer um de diversos outros antigénios das células T CD.

Estes heteroconjugados de anticorpos construídos conforme se descreveu anteriormente no Exemplo 1, foram os seguintes: a) um heteroconjugado CD5/CD2 compreendendo os anticorpos monoclonais 10,2 e 9,6; b) um heteroconjugado CD4/CD5 compreendendo os anticorpos monoclonais 10,2 e 9,3; c) um heteroconjugado CD5/CD4, compreendendo os anticorpos monoclonais 10,2 e G17-2; d) um heteroconjugado CD5/CD6, compreendendo os anticorpos monoclonais 10,2 e G3-6; e) um heteroconjugado CD5/CD7, compreendendo os anticorpos monoclonais 10,2 e G3-7; e f) um heteroconjugado CD5/CD8, compreendendo os anticorpos monoclonais 10,2 e G10-1. Todos os anticorpos monoclonais que se utilizaram para construir os heteroconjugados deste aspecto foram referidos antes.

Também se ensaiaram estes heteroconjugados quanto à sua capacidade para aumentar a mobilização do

Ca²⁺ citoplásmico nas células T, conforme se descreveu no Exemplo 1. Os resultados destas experiências apresentam-se no Quadro IV, a seguir. Indica-se no Quadro a concentração de cada um dos heteroconjugados que se utilizaram nestas experiências. As respostas de pico de $\lceil \text{Ca}^{2+} \rceil_i$ dos linfócitos do sangue periférico carregados de indo-1 ocorreu nos primeiros 10 minutos após estimulação. As células não estimuladas apresentaram um $\lceil \text{Ca}^{2+} \rceil_i$ de 130 nM. Conforme o Quadro mostra, os homoconjugados CD5/CD5 apresentaram um $\lceil \text{Ca}^{2+} \rceil_i$ de 180 nM. Ensaaiaram-se os heteroconjugados CD5/CD4 e CD5/CD8 nas sub-populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ respectivamente.

QUADRO IV

Actividade dos Heteroconjugados Anti-CD5 na
Mobilização do Cálcio

<u>Conjugados</u>	<u>Máximos de $\lceil \text{Ca}^{2+} \rceil_i$ (nM)</u>
CD5/CD5 (10,2/10,2, 20 µg/ml)	180
CD5/CD2 (10,2/ 9,6, 20 µg/ml)	204
CD5/CD28 (10,2/9,3, 10 µg/ml)	196
CD5/CD4 (10,2/G17-2, 2 µg/ml)	640
CD5/CD6 (10,2/G3-6, 2 µg/ml)	421
CD5/CD7 (10,2/G3-7, 15 µg/ml)	178
CD5/CD8 (10,2/G10-1, 2 µg/ml)	546

Conforme o Quadro IV indica, os heteroconjugados CD5/CD4, CD5/CD6 e CD5/CD8 apresentaram um aumento significativo na mobilização do cálcio em comparação com as células não estimuladas ou estimuladas com CD5/CD5. Pensa-se que estes heteroconjugados, tal como os outros heteroconjugados aqui descritos, são úteis para aumentar a activação das células T.

EXEMPLO IV

Neste Exemplo utilizou-se um heteroconjugado constituído por os anticorpos reactivos CD3 e CD5 para investigar o efeito das interacções entre os antigénios CD3 e CD45 sobre a activação de células T.

Preparações celulares. Prepararam-se conforme previamente descrito, células monocleares do sangue periférico e linfócitos não aderentes a lã de nylon de sangue periférico [Clark et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 82:1766 (1985) e Clark et al., Human Immunol., 16:100-113 (1986), que aqui se indicam como referência 7]. Resumidamente, obtiveram-se os linfócitos não aderentes a lã de nylon por separação em lã de nylon, conforme se segue: carregou-se uma coluna de nylon (preparada no Oncogen, Seattle, WA) com meio RPMI contendo soro de feto de vitela a 5% e utilizou-se, após incubação prévia durante 45 minutos a 37°C. Aplicaram-se as células à coluna e deixaram-se fluir dentro da coluna e, de-

pois, incubaram-se a 37°C durante 45 minutos. Recolheram-se as células da coluna, utilizando 6 ml de meios recentemente preparados, centrifugou-se duas vezes, durante 8 minutos a 1 200 rpm e, depois efectuou-se nova suspensão das mesmas, em tampão de proliferação (soro humano AB a 15%) (aproximadamente 1,5 ml). Contaram-se as células não aderentes e ajustou-se o volume de acordo com o habitual nestes ensaios.

Utilizaram-se os seguintes mAbs de rato Balb/c para os indicadores leucocitários humanos: 9,4 (IgG2a), anti-CD45 (Cobold, supra); G1-15 (IgG1) e 3AC5 (IgG2a), anti-CD45R (Ledbetter, supra e Ledbetter et al., in Perspectives In Immunogenetics and Histocompatibility, ed. Heise E. (ASHI, New York) pp. 325-340); 96,5 [Brown et al., J. Immunol., 127 (2):639-546 (1981)]. Anticorpos UCHL-1 (IgG1) anti-CD45 (forma 180) amavelmente cedido pelo Dr. P. Beverley (Smith, supra); G19-4 (IgG1), anti-CD3 (Ledbetter, supra); 9,6, anti-CD2, (anteriormente referido); e 9,3, anti-CD28 (anteriormente referido). Para se proceder à ligação cruzada do mAb do rato, utilizou-se o mAb, 187,1 anti-murino-específico-Kapa, [Ware et al., J. Immunol. Meth., 74:93-104 (1981)].

Preparação do Heteroconjugado de mAb. Prepararam-se os heteroconjugados de anticorpos monoclonais numa proporção molar de 1:1, com o ligante cruzado heterobifuncional GMBS (Calbiochem, La Jolla, CA) e cloridrato de 5-iminotiolano (Pierce Chemical CO., Rockford, IL) conforme

anteriormente descrito no Exemplo 1. De um modo mais particular, efectuou-se a diálise dos anticorpos (1 mg/ml), durante uma noite, contra tampão de acoplamento (Na_2HPO_4 -di-básico 0,1 M, NaCl 0,1 M hidratado sete vezes, a pH 7,5). Tiolou-se o primeiro anticorpo do conjugado com cloridrato de iminotiolano (2-IT de Pierce Chemical Co., Rockford, IL: para adição de 50 μl (0,5 mg) de solução 2-IT (10 mg/ml em tampão de ligação sob agitação. Tratou-se o segundo anticorpo do conjugado com GMBS: 5 μl (14 μg de solução de GMBS (1 mg em 360 μl de dimetilformamida (DMF)). Incubaram-se as soluções durante uma hora, à temperatura ambiente. Verteram-se os anticorpos em colunas separadas PD-10 (Pharmacia, Uppsala, Suécia) previamente equilibradas com tampão de acoplamento. Após escoamento de um volume de 2,6 ml, recolheram-se os anticorpos no dobro do volume original. Agitaram-se os anticorpos e incubaram-se à temperatura ambiente durante 5 horas e interromperam-se as reacções adicionando 1 μl de B-mercapto-etanol 25 mM (1 μl : 560 μl de tampão de acoplamento) e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Interrompeu-se esta reacção adicionando 11 μl (11 μg) de N-etil-maleimida (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) até uma concentração de 1 mg/ml em DMF.

Efectuou-se, durante a noite, a diálise dos conjugados contra solução salina de tampão fosfato (PBS). Separou-se o heteroconjugado CD3/CD45 resultante, dos anticorpos livres, numa coluna de Superose 6 FPLC, conforme descrito

no Exemplo 1 e designou-se por G19-4/9,4.

Na conjugação dos mAbs com biotina utilizou-se succinimida de biotina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) conforme previamente descrito [Hardy, R.R. in Handbook of Experimental Immunology, (ed. Weir et al.), (Blackwell, Oxford) pp. 31.1-31.2 (1986)], que aqui se indica como referência. O 12-miristato-13-acetato de forbolo (PMA) e a avidina obtiveram-se na Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. A Interleucina-2 recombinante (rIL2) foi adquirida em Genzyme (Boston, MA) e utilizou-se para promover a proliferação, nalguns ensaios. Mediu-se a proliferação das células T do sangue por incorporação de [^3H]-timidina (New England Nuclear; actividade específica de 27 Ci/mole; 1 Ci = 37 GBq) conforme se descreveu no Exemplo 1, anterior, utilizando 10^6 células por ml em cavidades de microtitulação de 200 μl . Especificando ainda mais, para os ensaios de proliferação, efectuou-se a cultura de células mononucleares, conforme descrito por Ledbetter et al., in Journal Immunol., 135:1819-1825 (1985), que aqui se indica como referência. Resumidamente, isolaram-se as células mononucleares a partir do sangue periférico por centrifugação de densidade num Ficoll-Hypaque, seguida da aderência a plástico para remover a maioria dos monócitos. Cultivaram-se as células em amostras quadruplicadas de $2,5 \times 10^5$ /ml em placas de microtitulação de 96 cavidades (Falcon, Becton Dickenson, Oxnard, CA), em meio RPMI contendo penicilina, estreptomicina e soro humano AB a

15% (Pel Freez, Brown Deer, WI). Utilizou-se fitohemaglutina (PHA; Wellcome Diagnostics, Greenville, NC) ou o mAb anti-CD3 (G19-4) acoplado a Sepharose para estimular as células T. Após três ou quatro dias de cultura, pulsaram-se as cavidades durante 6 horas com 0,5 μ Ci de [3 H]-timidina/cavidade (New England Nuclear, Boston, MA; 6,7 Ci/mole de actividade específica). Depois, recolheram-se as células em filtros de fibra de vidro utilizando um dispositivo de recolha celular, e mediu-se a radioactividade num contador de cintilações de líquido. Nalguns ensaios, utilizou-se IL2 recombinante (rIL-2; Genzyme, Boston, MA) a 25 U/ml. Mediu-se a absorção da [3 H]-timidina durante as últimas 6 horas num ensaio de 3 dias utilizando o mAb G19-4 pré-revestido, para as cavidades das placas microtituladoras a 10 μ g/ml, antes do ensaio. A concentração do mAb 9,4 anti-CD45 em solução foi de 1 μ g/ml e imobilizou-se na placa de microtitulação a 10 mg/ μ l. Efectuou-se a cultura de células em quaduplicado e apresentam-se as médias. Os desvios padrão foram $< 11\%$.

No Quadro V apresenta-se o resumo dos resultados.

Quadro VCD45 regula a proliferação das células T
após estimulação de CD3Proliferação (incorporação de
[³H]-timidina, cpmx10⁻³)

<u>Activação</u>	<u>PMA</u> <u>(1 ng/ml)</u>	<u>Meio</u>	<u>Anti-CD45</u> <u>em Solução</u>	<u>Anti-CD45</u> <u>imobilizado</u>
Meio	-	0,3	0,4	0,3
	+	0,5	0,5	0,4
Anti-CD3	-	137,9	143,5	32,3
imobilizado	+	204,3	198,3	93,2
+ rIL-2				
(100 unidades/ml)	-	196,3	183,9	67,1

O Quadro V demonstra que o anti-CD45 imobilizado conjuntamente com anti-CD3 inibiu a proliferação das células T em mais de 75%, enquanto o anti-CD45 em solução não o fez. O efeito inibidor de anti-CD45 imobilizado foi evidente embora na presença de uma concentração quase ótima de PMA ou de rIL2 exógeno.

Também se mediu a proliferação das células T após estimulação com o mAb anti-CD3 (G19-4) com o mAb anti-

-CD3 imobilizado e com os mAbs CD45R (G1-15 e 3AC5) imobilizados ou em solução. Mediu-se a proliferação conforme anteriormente referido para o anti-CD45. Utilizaram-se os mAbs anti-CD45R, G1-15 e 3AC5 a 1 $\mu\text{g/ml}$ em solução e imobilizados a 10 $\mu\text{g/ml}$. Utilizou-se um mAb 96,5 de IgG2a de controlo contra o antigénio p97 de melanoma como um controlo não reactivo a 1 $\mu\text{g/ml}$ em solução e imobilizado a 10 $\mu\text{g/ml}$. No Quadro VI apresentam-se os resultados desta experiência.

Quadro VI

CD45 regula a proliferação das células T
após a estimulação de CD3

<u>Activação</u>	<u>Meio</u>	<u>Proliferação (incorporação</u> <u>de [³H]-timidina cpmx10⁻³)</u>	
		<u>PMA</u> <u>(1 ng/ml)</u>	<u>rIL-2 100</u> <u>unidades/ml</u>
Meio	0,1	0,5	0,4
Anti-CD3			
imobilizado			
+ meio	143,6	281,5	291,8
+ G1-15 anti-CD45R			
solução	137,5	261,5	309,4
+3AC5 anti-CD45R			
solução	177,8	266,2	294,6
+ 96,5 (solução)	147,9	262,1	312,4
Anti-CD3			
imobilizado			
+ G1-15 anti-CD45R			
(imobilizado)	0,1	0,7	0,6
+ 3AC5 anti-CD45R			
(imobilizado)	10,1	68,2	95,5
+ 86,5 (imobilizado)	154,4	247,1	280,4

A inibição foi evidente quando se imobilizaram conjuntamente os mAbs CD45R (3AC5) ou CD45R (G1-15) com anti-CD3, mas tal não se verificou quando os mAbs CD45R se encontravam em solução. Mais uma vez, nem PMA nem rIL2 conseguiram ultrapassar esta inibição. O mAb de controlo, 96,5, contra o antigénio p97 de melanoma não inibiu a proliferação em resposta ao anti-CD3 imobilizado quando se encontrava presente quer em solução quer imobilizado conjuntamente com anti-CD3.

Para assegurar que esta inibição observada com o mAb CD45 imobilizado (9,4) não se devia simplesmente a um deslocamento do mAb CD3 (G19-4) da superfície plástica, cobriram-se placas de microtitulação apenas com anti-CD3, com anti-CD3 mais anti-CD45, ou com anti-CD3 mais o mAb de controlo, 96,5. Estimularam-se as células mononucleares do sangue periférico com o mAb anti-CD3, G19-4 imobilizado nas paredes de uma placa de microtitulação incubando à temperatura ambiente em solução salina tamponada com fosfato, durante 2 horas, a concentrações de 4, 8, 16 e 32 $\mu\text{g/ml}$, sozinho ou conjuntamente com mAb anti-CD45, 9,4, ou com mAb de controlo 96,5 à mesma concentração do mAb anti-CD3. Adicionou-se albumina de soro de bovino para permitir a ligação ulterior de proteínas. Utilizou-se como comparação a proliferação com mAb 9,4, CD45. Mediu-se a proliferação na ausência ou na presença de PMA a 1 ng/ml. Efectuou-se a cultura das células em quadruplicado durante 3 dias e pulsaram-se com $[^3\text{H}]$ -

-timidina durante as últimas 6 horas. A Figura 9 apresenta os resultados destas experiências (apresentam-se as médias e o erro padrão foi inferior a 15% da média para cada um dos pontos).

A Figura 9, demonstra que a) quanto mais anti-CD3 se utilizou para cobrir as cavidades, tanto maior foi a proliferação obtida o que é consistente com as referências anteriores [Geppert et al., J. Immunol. 138:1660-1666 (1987)]; b) o mAb CD45, 9,4, originou uma inibição substancial, em todas as concentrações, mas apenas quando imobilizado; e c) não houve essencialmente inibição originada quando se revestiu simultaneamente com o isotipo mAb, 96,5, de controlo o que indica que a inibição por intermédio do anti-CD45 não foi o resultado de um deslocamento de anti-CD3. A adição de 1 ng/ml de PMA às culturas inverteu a inibição pelo anti-CD45 imobilizado, apenas quando se revestiu com mAb a 4 µg/ml ou a concentrações inferiores, mas não a concentrações mais elevadas (Fig. 9B): Isto sugere que pode ser necessária uma concentração crítica de anti-CD45 em íntima proximidade com anti-CD3 na superfície plástica, para manter a inibição na presença de PMA. Pode fazer-se prosseguir a activação das células T de que resulta a proliferação, estimulando CD28 e CD2 com os mAbs 9,3 e 9,6, respectivamente, em solução, com subsequente ligação cruzada, num segundo passo, utilizando o mAb 187,1, anti-k [Van Lier et al., Eur. J. Immunol., 18:167-157 (1988) e Ledbetter et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84:1384-1388 (1987)]. Para se investigarem os

efeitos na ligação de CD45 neste sistema, adicionou-se anti-CD45 a anti-CD28 ou a anti-CD2, em solução com ou sem mAb 187,1 de ligação cruzada (Ware et al., supra). Mediu-se a proliferação por libertação de [^3H]-timidina conforme descrito antes. Utilizaram-se o mAb 9,3, anti-CD28 e o mAb 9,6, anti-CD2, para activação, a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada. Utilizou-se o mAb 9,4, anti-CD45 a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e utilizou-se o mAb 187,1, anti-k, para se proceder à ligação cruzada dos anticorpos numa relação final de 4:1 de mAb 187,1 para mAb do rato. Mediu-se a proliferação na presença (100 unidades/ml) e na ausência de rIL-2. O Quadro VII apresenta os resultados (os desvios padrão foram inferiores a 12% da média de cada ponto).

Quadro VII

CD45 regula a proliferação das células T
após estimulação de CD2 e CD28

<u>Estímulos</u>	<u>(100 unida</u> <u>des / ml)</u>	<u>Meio</u>	<u>Proliferação (incorporação de</u> <u>[³H]-timidina cpm x 10⁻³)</u>		
			<u>mAb</u> <u>187,1</u>	<u>Anti-</u> <u>CD45</u>	<u>Anti-CD45</u> <u>+ mAb 187,1</u>
Meio	-	0,2	0,3	1,6	0,4
	+	6,8	4,2	37,6	2,5
Anti-CD28	-	0,2	4,3	47,4	0,4
	+	12,6	36,1	72,5	9,6
Anti-CD2	-	0,5	0,2	12,7	0,2
	+	4,4	7,0	37,3	4,0

É evidente que apenas a adição de anti-CD45 po-
 dia promover a proliferação celular ou aumentar a prolifera-
 ção induzida pelos mAbs CD2 ou CD28 sem haver necessidade de
 rIL2 exógena (Quadro VII). Em todas as circunstâncias, a adi-
 ção ulterior de rIL2 aumentou a proliferação celular mesmo
 na ausência de outros estimulantes. Estes fenômenos podem
 ser causados por um efeito da ligação de CD45 na expressão
 dos receptores de grande afinidade para IL2 (Ledbetter,
 supra). Em contrapartida, a ligação cruzada de CD45 a CD2 ou

a CD28 pela adição do mAb 187,1, anti-K inverteu o efeito estimulante de CD45 apenas e reduziu a estimulação por CD2 ou CD28 (Quadro VII) quer na presença, quer na ausência de rIL2. Isto não se deve a uma actividade não específica inibidora de 187,1, uma vez que as estimulações por CD28 ou CD2 foram aumentadas por 187,1 quando não se incluiu o mAb 9,4, CD45.

CD3, CD2 e CD28 são ligados a esquemas de transdução de sinal de que resulta um aumento no $[Ca^{2+}]_i$ quando estes receptores se encontram ligados à superfície celular. $[L$ Ledbetter et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84:1384-1388 (1987) $]$.

Mediu-se o $[Ca^{2+}]_i$ após ter-se procedido à ligação cruzada dos receptores de CD3, CD2 ou CD28 na presença ou na ausência do mAb 9,4, CD45 (Fig. 10). Nesta experiência, ligaram-se mAbs conjugados com biotina com células T do sangue periférico e depois cruzaram-se na superfície celular pela adição de avidina. Mediu-se o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ nas células T mononucleares do sangue periférico carregadas com indo-1 (Molecular Probes, Junction City, OR), após se ter procedido à ligação cruzada dos receptores nas células T quer sós, quer conjuntamente com o mAb 9,4, anti-CD45 ou com mAb 3AC5, anti-CD45R, conforme se segue. Indicam-se as condições com referência à Figura 10:

1. Procedeu-se à ligação cruzada do receptor CD3 com o mAb G19-4, anti-CD3 (2 $\mu\text{g/ml}$) conjugado com biotina no momento = 1,5 minutos, seguida da adição de avidina (8 $\mu\text{g/ml}$) no momento = 5,5 minutos (—). Comparou-se isto com a mesma ligação cruzada do receptor CD3 na presença de mAb 9,4, anti-CD45 (10 $\mu\text{g/ml}$) (-----) ou com mAb 9,4, anti-CD45 conjugado com biotina (10 $\mu\text{g/ml}$) seguido de avidina (48 μg) (.....). Também se utilizou um controlo adicional de mAb 9,4, anti-CD45 (10 $\mu\text{g/ml}$) conjugado com biotina, seguido de avidina (40 $\mu\text{g/ml}$) (-----) (Fig. 10A).

2. Comparou-se o efeito de 25 $\mu\text{g/ml}$ do mAb G19,4, anti-CD3 (—) com 50 $\mu\text{g/ml}$ de um heteroconjugado CD3/CD45 do mAb G19-4, anti-CD3 e do mAb 9,4, anti-CD45 (.....) (Fig. 10B).

3. Procedeu-se à ligação cruzada do receptor CD2 com 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 9,6, anti-CD2 conjugado com biotina que se adicionou no momento = -3 minutos, seguida da adição de 40 $\mu\text{g/ml}$ de avidina no momento = 1,5 minutos (—) (Fig. 10C).

4. Procedeu-se à ligação cruzada do receptor CD28 com 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 9,3, anti-CD28, conjugado com biotina que se adicionou no momento = -3 minutos, seguindo-se a adição de 40 $\mu\text{g/ml}$ de avidina no momento = -3 minutos

(—) e comparou-se com a ligação cruzada simultânea dos receptores CD28 e CD45 utilizando 10 $\mu\text{g/ml}$ do mAb 9,3, anti-CD28 e de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 9,4, anti-CD45, que se adicionaram no momento = -3 minutos seguindo-se a adição de 80 $\mu\text{g/ml}$ de avidina, no momento = 1,5 minutos (.....) (Fig. 10D); e

5. Procedeu-se à ligação cruzada do receptor CD4 pela adição de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb G17-2, anti-CD4, conjugado com biotina no momento = -3 minutos, seguindo-se a adição de 40 $\mu\text{g/ml}$ de avidina aos 1,5 minutos (—). Comparou-se isto com a ligação cruzada simultânea dos receptores CD4 e CD45 pela adição de 10 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 9,4, anti-CD45 conjugado com biotina -3 minutos, seguida da adição de 80 $\mu\text{g/ml}$ de avidina aos 1,5 minutos (.....). Também se apresenta a comparação com o mAb G17-2, anti-CD4, conjugado com biotina (10 $\mu\text{g/ml}$) mais o mAb 9,4, anti-CD45 (10 $\mu\text{g/ml}$) (não conjugado), seguida da adição de 40 $\mu\text{g/ml}$ de avidina aos 1,5 minutos (—.—) (Figura 10E).

A Figura 10A-E apresenta os resultados destas experiências.

É evidente que o acréscimo de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se observou após ter-se procedido à ligação cruzada de CD3, CD2 e CD28 foi inibida pela presença de 9,4 conjugado com biotina. Quando não se bitinilou 9,4 e, por esse motivo, sem ligação cruzada pela avidina, ainda se observou um peque

no decréscimo na extensão da mobilização do cálcio induzida por anti-CD3 (Fig. 10A). Contudo, a inibição completa parece necessitar que CD45 e CD3 se encontrem muito próximos. Para além disso, um heteroconjugado de anti-CD45 e de anti-CD3 foi incapaz de aumentar directamente $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 10B) embora ensaios de imunofluorescência com uma imunoglobulina anti rato tenham demonstrado que o heteroconjugado se podia ligar a ambos os receptores na superfície celular (não se apresenta os dados) e que 25 μ g de anti-CD3 podiam despoletar uma forte reacção do cálcio. Os mAbs CD45R tais como 3AC5 foram capazes de inibir, parcialmente, a resposta de $[Ca^{2+}]_i$ quando ligados a mAbs reactivos com os receptores celulares tais como os exemplificados para CD2 (Fig. 10C). A inibição parcial conseguida pelo mAb para CD45R pode reflectir a expressão da isoforma CD45R em algumas mas não em todas as células T. (Ledbetter, supra). Em contraste com os efeitos inibidores sobre CD3, CD2 e CD28, a ligação de CD45 a CD4 proporciona um aumento de sinalização forte e reproduzível em comparação com a ligação cruzada de CD4 a si próprio (Fig. 10E). Isto ocorreu sem um aumento no número de células reactivas demonstrando que as mesmas células CD4 positivas respondiam mais eficazmente a seguir à ligação de CD45 e de CD4. Deste modo, parece que CD45 regula, aumentando ou diminuindo, a sinalização de transmembrana dependendo do receptor com o qual está em interacção.

Estudos prévios com CD45 sugeriram que este

pode funcionar para regular, quer aumentando quer diminuindo, a actividade linfocítica. (Ledbetter, supra; Harp, supra e Martorell, supra). Os mAbs solúveis para CD45 ou CD45R estimulam conjuntamente com PHA ou com anti-CD3 ligado a gotas o aumento da produção de IL-2, da expressão do receptor IL-2 e a proliferação das células T. O anti-CD45 solúvel pode actuar em cooperação com os mAbs CD2 ou CD28 (Quadro VI). Estes efeitos de estimulação conjunta limitam-se às células CD4⁺ e não se observaram com as células CD8⁺ que não expressam CD4. Isto pode dever-se, em parte, ao facto de CD45 possuir um efeito característico sobre CD4 distinto da sua acção sobre os outros antigénios da superfície das células, tais como CD3 ou CD2; Quando CD45 se associa estreitamente a CD4, actua de modo a acelerar e aumentar o sinal de cálcio que é transmitido através de CD4 ao passo que inibe a transdução do sinal quando acoplado a CD3 e CD2 (Fig. 10).

Os Exemplos anteriores (4) indicam que os efeitos inibidores de anti-CD45 se demonstram mais evidentes sob condições que coloquem CD45 em contacto íntimo com elementos de transdução de sinal, tais como os receptores das células T, CD2, CD3, CD5 ou CD28 conforme se demonstrou pela utilização do heteroconjugado CD4/CD45 da presente invenção. O antigénio para anti-CD45 pode actuar muito precocemente na activação linfocítica inibindo a mobilização do cálcio intracelular livre, que se detecta normalmente dentro de

30 a 60 segundos. Também se demonstraram os efeitos de amplificação de anti-CD45 colocando o receptor CD45 na proximidade do receptor CD4. Estes resultados sugerem que os heteroconjugados que contêm moléculas reactivas com os receptores nos linfócitos podem proporcionar um método alternativo para induzir a interacção entre os receptores, aumentando ou inibindo a activação e funcionamento dos linfócitos, incluindo as células T e as células B.

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Heteroconjugado útil na regulação de linfócitos, caracterizado pelo facto de incluir pelo menos duas moléculas susceptíveis de se ligarem a antigenes nos linfócitos, estando as referidas moléculas reticuladas uma em relação à outra e sendo cada molécula reactiva com um antigene diferente localizado na superfície dos linfócitos individuais.

2.- Heteroconjugado de anticorpo útil na activação de linfócitos T, caracterizado pelo facto de incluir pelo menos duas moléculas de anticorpo reticuladas uma em relação à outra, sendo cada anticorpo reactivo com um antigene diferente localizado na superfície de linfócitos T.

3.- Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2,

caracterizado pelo facto de o antigene ser um antigene CD na superfície de um linfócito T.

4.- Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de o antigene ser um antigene CD na superfície de um linfócito B.

5.-Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de uma das moléculas do heteroconjugado ser reactiva com o receptor de células T ou o seu antigene CD3 associado.

6.- Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de uma das moléculas do heteroconjugado ser reactiva com o antigene da superfície de células CD5 T.

7.-Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as referidas moléculas serem anticorpos.

8.- Heteroconjugado de anticorpo CD3/CD4.

9.- Heteroconjugado de anticorpo, G19-4/G17-2.

10.- Heteroconjugados de anticorpos, caracterizados pelo facto de serem seleccionados do grupo que consiste em CD3/CD2, CD3/CD6,

CD3/CD7 e CD3/CD8.

11.- Heteroconjugados de anticorpos, caracterizados pelo facto de serem seleccionados do grupo que consiste em CD5/CD4, CD5/CD6 e CD5/CD8.

12.-Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo facto de uma das moléculas do heteroconjugado ser reactiva com o antigene CD45 ou isoformas do antigene CD45.

13.-Heteroconjugado de anticorpo CD3/CD45.

14.- Heteroconjugado de anticorpo G19-4/9,4.

15.- Heteroconjugados de anticorpos, caracterizados pelo facto de serem seleccionados do grupo que consiste em CD2/CD45, CD3/CD45, CD4/CD45 e CD28/CD45.

16.- Heteroconjugados de anticorpos, caracterizados pelo facto de serem seleccionados do grupo que consiste em CD2/CD45R, CD3/CD45R, CD4/CD45R e CD28/CD45R.

17.- Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 2 ou 7, caracterizado pelo facto de os anticorpos incluírem fragmentos de anticorpos seleccionados do grupo que consiste em fragmentos

Fab e F (ab')₂.

18.- Heteroconjugado de anticorpo com a reivindicação 2 ou 7, caracterizado pelo facto de os anticorpos serem monoclonais.

19.- Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 2 ou 7, caracterizado pelo facto de os anticorpos serem quiméricos.

20.- Anticorpo bi-específico, caracterizado pelo facto de possuir afinidade de ligação para dois antígenos diferentes na superfície de linfócitos T.

21.- Heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as referidas moléculas serem péptidos ligados reactivos com antígenos de superfície de linfócito.

22.- Processo de activação de linfócitos T, caracterizado pelo facto de se fazer contactar os linfócitos com pelo menos um heteroconjugado de acordo com a reivindicação 2.

23.- Processo para a regulação da função de linfócitos T e/ou linfócitos B, caracterizado pelo facto de se fazer contactar os linfócitos com o heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2.

24.- Processo para a regulação da função de linfócitos T e/ou linfócitos B de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo facto de se fazer contactar os linfócitos com um heteroconjugado que contém pelo menos um anticorpo e em que pelo menos um dos anticorpos do heteroconjugado é reactivo com o antigene de superfície de células CD45 ou uma isoforma do antigene CD45.

25.- Processo para o tratamento de doenças, caracterizado pelo facto: a) de se activarem linfócitos T in vitro fazendo contactar os linfócitos com pelo menos um heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 e b) de se re-infundirem os linfócitos activados num dador autólogo.

26.- Processo para a preparação de composições aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico úteis no tratamento de doenças, caracterizado pelo facto de se incorporar uma quantidade farmacêuticamente eficaz de pelo menos um heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2.

27.- Processo para o tratamento de doenças, caracterizado pelo facto de se administrar a um indivíduo uma quantidade farmacêuticamente eficaz de pelo menos uma composição obtida de acordo com a reivindicação 26.

28.- Processo de acordo com a reivindicação 25 ou 27,

caracterizado pelo facto de a doença ser seleccionada do grupo que consiste em doenças infecciosas, cancro, SIDA e doenças auto-imunes.

29.- Processo de diagnóstico de um defeito numa função de receptor CD num paciente que sofre de uma doença que envolve desregulação ou disfunção de células T, caracterizado pelo facto de se medir a actividade de mobilização do cálcio de um heteroconjugado de acordo com a reivindicação 1 ou 2 nos linfócitos T desse paciente comparada com a actividade dos anticorpos não conjugados que produzem os componentes do heteroconjugado.

30.- Processo para tratamento de doenças auto-imunes, caracterizado pelo facto de se administrar o heteroconjugado de acordo com a reivindicação 8 ou 12 para regular selectivamente subpopulações de linfócitos T e B.

31.- Processo para a preparação de heteroconjugados apropriados para a regulação de linfócitos, caracterizado pelo facto de se promover a reticulação de pelo menos duas moléculas capazes de se ligarem a antigenes em linfócitos, sendo cada molécula reactiva com um antigene diferente na superfície de linfócitos individuais.

32.- Processo de acordo com a reivindicação 31, caracte-

90 195

-95-

R E S U M O

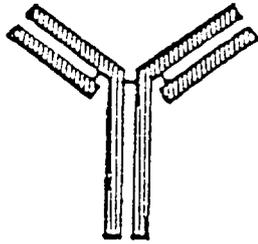
"Heteroconjugados de anticorpos para utilização na regulação da actividade linfocítica"

A presente invenção refere-se a novos heteroconjugados de anticorpos e à sua utilização no reforço ou inibição de linfócitos T ou B. Os heteroconjugados incluem pelo menos duas moléculas reticuladas uma com a outra, sendo cada anticorpo reactivo com um antigene diferente de superfície de célula na mesma célula. Os heteroconjugados actuam por ligação a linfócitos por intermédio da interacção dos anticorpos dos heteroconjugados com os seus antigenes de superfície de células respectivos e pondo esses antigenes na proximidade física um do outro, do que resulta uma activação reduzida ou reforçada e função dos linfócitos. Os heteroconjugados, processos e composições da presente invenção são úteis na regulação da função linfocítica, resultando no aperfeiçoamento das respostas imunes celulares nos vários estados de doença.

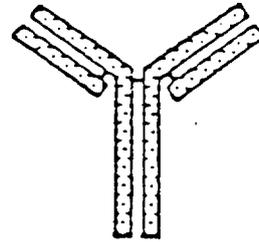
Original depositado em 11 de Novembro de 1955

Tagliarini

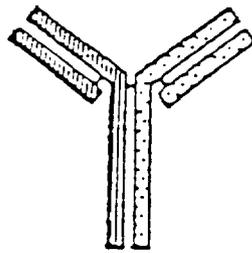
4



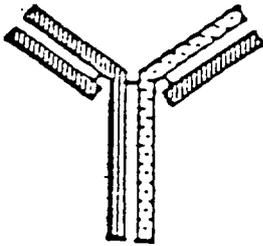
$L_1H_1H_1L_1$
Mab 1 Parenteral
(Bivalente)



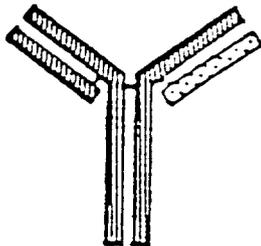
$L_2H_2H_2L_2$
Mab 2 Parenteral
(Bivalente)



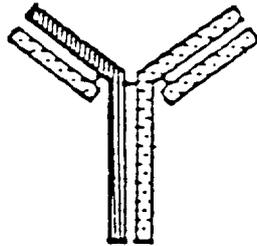
$L_1H_1H_2L_2$
Biespecifico



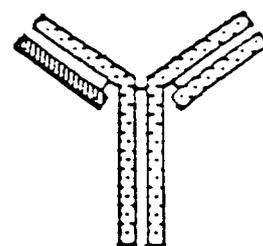
$L_1H_1H_2L_1$



$L_1H_1H_1L_2$

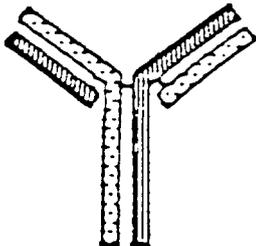


$L_2H_1H_2L_2$

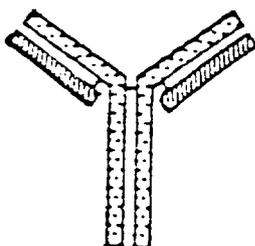


$L_1H_2H_2L_2$

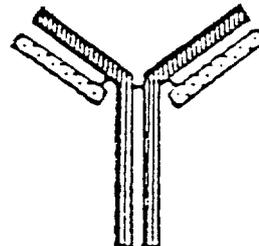
Monovalente



$L_1H_2H_1L_2$



$L_1H_2H_2L_1$



$L_2H_1H_1L_2$

Inactivo

