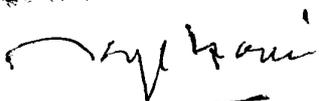


Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
98.840 V			
Requerente (71): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, uma sociedade organizada e existindo segundo as leis do Estado de Delaware, Estados Unidos da América, norte-americana, industrial, com sede em 345 Park Avenue, New York, New York 10154, Estados Unidos da América			
Inventores (72): EDITH ANN WOLFF e HOWARD V. RAFF			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
31.08.1990	US	07/575,725	
26.08.1991	US	07/748,662	
Epígrafe: (54) "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS CONTENDO ANTICORPOS MONOCLONAIS HOMOCONJUGADOS"			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57)			
<p>Descrevem-se anticorpos monoclonais homoconjugados com grande afinidade para os antigénios, proporcionando maior actividade terapêutica e que são utilizados para a preparação de composições farmacêuticas para tratamento e diagnóstico de certas doenças.</p> <p>Os homoconjugados, são preparados, normalmente, com anticorpos monoclonais da classe IgG que se ligam ao mesmo determinante antigénico e que estão ligados de forma covalente, por ligação cruzada sintética.</p>			



Modalidade e n.º (11)	T D	Data do pedido (22)	Classificação Internacional (51)
Resumo (continuação) (57)			<u>2</u>
<p>Estes homoconjugados são constituídos por pelo menos dois monómeros de imunoglobulina de modo a proporcionarem uma molécula idêntica a IgG que é tetravalente, hexavalente ou mais, relativamente ao antigénio seleccionado. Os homoconjugados são capazes de atravessarem a placenta.</p>			
<p>Descrevem-se ainda métodos de tratamento que utilizam os homoconjugados citados antes.</p>			
<p>© Agente Oficial da Propriedade Industrial</p> <p></p> <p>(Dr. Jorge Garin)</p>			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS



**"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS  
CONTENDO ANTICORPOS MONOCLONAIS HOMOCONJUGADOS"**

**Antecedentes da Invenção**

Os anticorpos monoclonais têm vindo a revelar-se altamente promissores como agentes imuno-terapêuticos extremamente específicos e com potenciais efeitos secundários mínimos. Deste modo, estão a ser desenvolvidos anticorpos monoclonais para uma grande diversidade de aplicações, tais como o tratamento de tumores, doenças infecciosas e distúrbios de auto-imunidade, regulação do sistema imunológico e outras. Infelizmente, apenas alguns anticorpos monoclonais possuem as qualidades que tornam possível utilizá-los de um modo bem sucedido no processo de transição da pesquisa e desenvolvimento para o regime clínico.

A utilidade terapêutica ou de diagnóstico dos anticorpos monoclonais resulta de diversos factores para além da simples fixação ao antigénio desejado. O anticorpo tem de possuir uma afinidade de fixação que se considere suficiente, o que constitui uma medida do poder inerente à fixação do anticorpo ao seu epítoto correspondente. Tem de possuir também um nível relativamente elevado de avidéz, o qual reflecte a estabilidade total do complexo anticorpo-

-antigénio baseando-se na valência do anticorpo (e do anti-génio) e no arranjo geométrico dos componentes intervenientes. Tanto a afinidade como a avidéz de diferentes anticorpos podem variar muito.

Muitas vezes o anticorpo monoclonal seleccionado tem de pertencer a um isótipo adequado ou a uma subclasse para que se inicie com eficácia as funções efectoras desejadas. Estas funções incluem a fixação do complemento, a fixação aos macrófagos efectores ou aos leucócitos polimorfonucleares ou ainda outras propriedades que possam ser necessárias para uma determinada aplicação terapêutica. O isótipo afecta também a bio-distribuição, a semi-vida, a passagem transplacentar e outras características do anticorpo.

De um modo geral, dá-se preferência aos anti-corpos IgG relativamente aos anticorpos IgM na maioria das utilizações terapêuticas. Quando se comparam os IgM com IgG, verifica-se que os IgG têm habitualmente semi-vidas, in vivo, mais longas e são capazes de atravessar a placenta atingindo o feto e, quando formulados sob a forma de uma composição farmacêutica, podem ter um período de vida mais longo quando armazenados. No entanto, as moléculas de IgG são monoméricas e têm apenas dois sítios de fixação do antigénio, pelo que a avidéz é muito menor do que a de um anticorpo IgG comparável, que é pentavalente

e que possui dez sítios de fixação do antigénio.

Verifica-se com frequência que é muito difícil, com a tecnologia convencional, identificar os anticorpos monoclonais que possuem a especificidade de fixação ao antigénio, a afinidade e as funções efectoras desejadas. Desenvolveram-se técnicas de ADN recombinantes para evitar o método imprevisível e extremamente trabalhoso de se efectuar um simples rastreio de grandes números de células transformadas ou fundidas produtoras de anticorpos. Clonaram-se os genes que codificam as regiões variáveis (ou hiper-variáveis) de fixação do antigénio, de um anticorpo que possuía uma especificidade de fixação desejada, a seguir aos genes que codificam as regiões constantes do anticorpo que medeiam as funções efectoras desejadas. Ver, por exemplo, a patente de invenção norte-americana Nº 4 816 397, as publicações do European Patent Office EP 173 494 e 239 400 e a publicação do PCT WO 89/07142. Estes procedimentos podem também ser bastante trabalhosos e têm tido apenas validade experimental limitada. Mesmo nos casos em que se utilizam estes procedimentos, pode-se ser confrontado com um anticorpo de IgG recombinante que não possua avidéz suficiente para iniciar funções efectoras biologicamente importantes ou com moléculas de IgM que possuam a actividade terapêutica desejada mas, que possuam as desvantagens gerais associadas a IgM tal como anteriormente se referiu.

Pode melhorar-se a avidéz dos anticorpos IgG aumentando a valência das moléculas para um número superior a dois. Mais interacções entre o anticorpo e o antígeno originariam ligações mais estreitas e estabilizariam a interacção anticorpo-antigénio, o que constitui geralmente um importante contributo para a utilização terapêutica. Os anticorpos IgG de alta avidéz (através de uma ligação multivalente) e que têm as funções efectoras desejadas seriam altamente preferidos em relação aos anticorpos comparáveis de baixa avidéz, embora até à data não tenham sido ainda descritos anticorpos possuidores de tais características.

De acordo com o anteriormente exposto, conclui-se que nesta especialidade o que se torna necessário são os meios para a produção de anticorpos IgG de alta avidéz e que possuam as funções efectoras desejadas, ao mesmo tempo que possibilitem evitar muitas das dificuldades inerentes aos trabalhos que envolvam IgM. A presente invenção preenche de um modo notável estas e outras necessidades.

#### SUMÁRIO DA PRESENTE INVENÇÃO

Os anticorpos homoconjugados possuem uma eficácia terapêutica melhorada em comparação com os correspondentes anticorpos monoméricos iniciais. Esta actividade pode dever-se, inter alia, a interacções de maior avidéz e funções efectoras melhoradas. De acordo com o anteriormente exposto,

os anticorpos que se ligam ao mesmo antigénio e especialmente ao mesmo determinante antigénico são covalentemente unidos por ligação cruzada de um ao outro por acoplamento químico de síntese para proporcionar estes homoconjugados. Os homoconjugados englobam geralmente pelo menos duas a três moléculas de anticorpo, normalmente da classe das IgG. Os anticorpos consistem preferencialmente em anticorpos monoclonais que podem pertencer a diversas espécies. Para administração aos seres humanos os anticorpos serão normalmente de origem humana ou de murino ou possuirão regiões constantes humanas.

Deste modo, proporcionam-se composições farmacêuticas que incorporam um veículo farmacêuticamente aceitável e pelo menos duas moléculas de anticorpo IgG, que se ligam essencialmente ao mesmo determinante antigénico e que se encontram quimicamente ligadas uma à outra por uma ligação covalente de síntese. Podem utilizar-se com fins terapêuticos os anticorpos homoconjugados e as suas composições farmacêuticas em métodos de tratamento de doenças relacionadas com antigénios, por exemplo, para promover a protecção contra infecções, tais como as infecções provocadas pela E. coli ou pelos estreptococos do grupo B, inibir o crescimento de tumores da mama e outros, regular a resposta imunológica e similares. Uma vez que os homoconjugados de anticorpos IgG são capazes de atravessar a placenta, podem utilizar-se as preparações para tratar o feto

no útero.

De acordo com um outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um melhoramento substancial nos métodos para administração terapêutica de anticorpos monoclonais a um paciente, para o tratamento de uma doença associada a um antigénio. O melhoramento engloba a administração ao paciente de anticorpos monoclonais homoconjugados com ligação cruzada por covalência e que têm pelo menos duas moléculas de anticorpo IgG que se ligam ao mesmo determinante antigénico do antigénio associado à doença. De acordo com os aspectos preferenciais da presente invenção, os anticorpos têm ligação cruzada por pontes de dissulfureto.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1, apresenta cromatogramas de perfis de FPLC de misturas de homoconjugados de IgG, com o tempo de retenção representado ao longo do eixo do X e o valor  $A_{280}$  representado ao longo do eixo do Y; Os picos designados por A, B e C representam, respectivamente, fracções triméricas, diméricas e monoméricas;

A Figura 2 ilustra a actividade de fixação acrescida em EIE de homoconjugados (dímeros ou trímeros) em comparação com os monómeros iniciais do anticorpo monoclonal D3, um anticorpo monoclonal de IgG humana que se liga ao

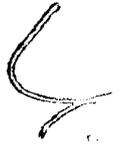
grupo hidrato de carbono dos estreptococos do grupo B;

A Figura 3 ilustra a actividade de fixação acrescida de homoconjugados (dímeros ou trímeros) em comparação com os monómeros iniciais do anticorpo monoclonal 5E1-G, um anticorpo monoclonal de IgG humana que se fixa ao hidrato de carbono capsular da E. coli K1;

A Figura 4, ilustra a actividade de fixação acrescida em EIE de homoconjugados (dímeros) em comparação com os monómeros iniciais de BR64, um anticorpo monoclonal de IgG de murino que se fixa a um antigénio associado ao tumor da mama humana;

A Figura 5, ilustra a actividade de fixação comparativa do anticorpo homoconjugado dimérico BR96 na presença de linhas de células tumorais, apresentando a Figura 5A a actividade de fixação na presença de uma linha de células do tumor da mama humana H3760B e indicando a Figura 5B a actividade de fixação na presença de uma linha de células do tumor do pulmão humano H2707, apresentando a Figura 5C a actividade de fixação na presença de uma linha de células do tumor do pulmão humano H2987, representando a Figura 5D a actividade de fixação na presença de uma linha de células do tumor da mama humana H3396;

A Figura 6, representa a actividade opso



nica acrescida na presença dos estreptococos do grupo B, dos homoconjugados diméricos e triméricos do anticorpo monoclonal humano D3, em comparação com o monómero de IgG inicial;

A Figura 7 representa a determinação da opsonofagocitose melhorada pelos homoconjugados do anticorpo monoclonal D3 na presença dos estreptococos do grupo B, estirpes M94 e I334, em comparação com a actividade do anticorpo monomérico D3;

A Figura 8, indica a actividade opsónica acrescida na presença de E. coli K1 dos homoconjugados diméricos e triméricos do anticorpo monoclonal humano 5E1-G em comparação com o monómero de IgG inicial;

A Figura 9 representa a determinação da opsonofagocitose melhorada conferida pelos homoconjugados do anticorpo monoclonal 5E1-G na presença das estirpes H16 e A14 de E. coli K1 3 em comparação com a do monómero do anticorpo;

A Figura 10 demonstra a citotoxicidade acrescida dependente do complemento na presença da linha de células do tumor da mama H3630 conferida pelos homoconjugados diméricos do anticorpo monoclonal BR64 em comparação com o monómero da IgG inicial;

A Figura 11 ilustra a citotoxicidade con-



ferida pelos homoconjugados de BR96 e pelo anticorpo monoclonal monomérico na presença de uma linha de células do tumor da mama H3396; e

A Figura 12, indica a protecção in vivo conferida pelos homoconjugados do anticorpo monoclonal D3 e pelo monómero de controlo em diferentes concentrações do anticorpo.

### DESCRIÇÃO DOS ASPECTOS ESPECÍFICOS

A presente invenção proporciona homoconjugados de anticorpos monoclonais na presença de antigénios seleccionados e ainda métodos para a preparação dos referidos homoconjugados. Mediante ligação química de moléculas de anticorpo preparam-se homoconjugados que possuem uma valência acrescida e duas ou mais regiões Fc. De acordo com estes procedimentos, podem obter-se diversos efeitos incluindo, inter alia, aumentos na avidéz de ligação, na fixação do complemento, na activação celular, na opsonofagocitose, etc. Deste modo, a presente invenção proporciona a possibilidade de se converterem anticorpos de utilidade provavelmente limitada in vivo em anticorpos que possuam características que conduzam de um modo mais significativo a uma actividade terapêutica pretendida. A homoconjugação pode servir, por exemplo, para se converter um monómero de IgG de fraca avidéz de ligação num monómero de avidéz superior



e com maior capacidade de promover funções efectoras que provavelmente não seriam atingidas na situação anterior.

Por "homoconjugado" entende-se a associação covalente ou a ligação de duas, três ou mais moléculas de anticorpo que se ligam ao mesmo determinante antigénico, formando desse modo homodímeros, homotrímeros, etc. de anticorpo. Podem preparar-se os homoconjugados a partir de dois, três ou mais anticorpos monoclonais diferentes (isto é, os anticorpos produzidos por diferentes linhas de células perpétuas) que se ligam aos mesmos determinantes antigénicos (epítopes) no antigénio. Os anticorpos monoclonais que constituem o homoconjugado podem ser diferentes (produzidos a partir de distintas linhas de células) mas, de preferência, serão os mesmos, isto é, obtidos a partir da mesma linha de células, constituindo deste modo uma preparação relativamente homogénea de anticorpos monoclonais com uma especificidade de fixação antigénica virtualmente idêntica. A expressão "fixação ao mesmo ou essencialmente ao mesmo epítope" refere-se aos anticorpos monoclonais que são capazes de uma competição recíproca ou não recíproca com outros para ligação ao antigénio. O especialista saberá como conduzir os ensaios imunológicos de competição, como, por exemplo, o ensaio radioimunológico ou o ensaio imunológico enzimático, tal como se encontra descrito de um modo geral, por exemplo, na patente de invenção norte-americana Nº 3 817 837; e por



Harlow e Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press, 1988; e Day, Advanced Immunochemistry, NY, Wiley-Liss Publicarions 1990, considerando-se o seu conteúdo aqui incorporado por referência.

Também se pode alterar, de modo a obterem-se as funções efectoras desejadas, as regiões Fc dos anticorpos monoclonais utilizados para a homoconjugação ou outros aspectos da molécula de imunoglobulina que essencialmente não afectam a especificidade de ligação ao antigénio. Pode ser aconselhável, por exemplo, substituir o domínio Fc para ligação da proteína A numa molécula que não possua esta capacidade para tornar mais fácil a purificação ou outra operação semelhante. Podem efectuar-se outras substituições para diminuir a imunogenicidade, aumentar ou diminuir a activação do complemento, a ligação à célula receptora, o controlo da velocidade catabólica, a transferência placentar ou intestinal, a capacidade para participar na citotoxicidade celular dependente do anticorpo e outros aspectos da regulação imunológica. Localizaram-se numerosas funções do anticorpo num domínio ou domínios da região constante. Ver, Paul, Fundamental Immunology, New York, NY, Raven Press, 1984, que aqui se incorpora a título de referência. Encontra-se disponível uma grande variedade de técnicas para a preparação de imunoglobulinas recombinantes, como, por exemplo, as referidas na patente de invenção norte

-americana Nº 4 816 397 nas publicações do European Patente Office, EP 173 494 e 239 400 e na publicação PCT WO 89/07142 que aqui se incorporam a título de referência. De acordo com o anteriormente exposto, as imunoglobulinas homoconjugadas podem ser quaisquer entre as de cadeia densa e suas sub-classes. As imunoglobulinas de cadeia leve podem ser de tipo K (capa) ou  $\lambda$  (lambda).

Na presente invenção, dá-se especial preferência aos homoconjugados de anticorpos que possuam cadeias densas  $\gamma$  (gama) de modo a formar homoconjugados de moléculas de IgG multivalentes. Geralmente, dá-se preferência às sub-classes de IgG 1, 2, 3 e 4 (humanas), 1, 2a, 2b e 3 (murino), às sub-classes humanas 1 e 3 e às sub-classes de murino 1, 2a e 2b nas aplicações em que seja necessária uma máxima fixação do complemento, ligação a monócitos, macrófagos e células polimorfonucleares e capacidade para atravessar a placenta. Podem aumentar-se substancialmente as funções efectoras dos anticorpos IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> humanos, de acordo com procedimentos de homoconjugação que são descritos na presente invenção.

A presente invenção contempla ainda a utilização, em determinadas circunstâncias dependendo do uso pretendido, dos anticorpos de cadeia densa de tipo  $\alpha$  (alfa),  $\mu$  (miu),  $\epsilon$  (epsilon) ou  $\delta$  (delta) para homoconjugação, con-



forme aqui se descreve.

A afinidade de fixação dos anticorpos para utilização nos homoconjugados poderá ser variável, mas será geralmente de pelo menos  $10^{-4}$  M, estará habitualmente compreendida entre pelo menos  $10^{-6}$  M e  $10^{-7}$  M e encontrar-se-à normalmente compreendida entre cerca de  $10^{-8}$  e cerca de  $10^{-9}$  M ou superior. A avides dos homoconjugados preparados a partir destes anticorpos estará geralmente compreendida entre pelo menos cerca de  $10^{-6}$  M e  $10^{-7}$  M e preferencialmente entre pelo menos cerca de  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$  M, podendo ainda ser superior. Os meios para determinação da afinidade e da avides são conhecidos e encontram-se descritos em Day, Advanced Immunochemistry, supra. Embora se possa aumentar quantitativamente a avides dos homoconjugados, de um modo geral, também se aumentará qualitativamente a avides e as funções efectoras dos homoconjugados, como evidenciado por exemplo, nos ensaios de fixação ao antigénio e outros ensaios funcionais que aqui se descrevem e que farão parte do conhecimento geral dos especialistas.

As imunoglobulinas que constituem os homoconjugados podem pertencer a qualquer espécie ou combinação de espécies a partir das quais podem ser preparados os anticorpos monoclonais. Embora seja relativamente fácil produzir anticorpos monoclonais de murino, com a especificidade de fixação antigénica desejada, é muito mais difícil produ-

zir anticorpos monoclonais de seres humanos com a especificidade desejada e que possuam as propriedades desejadas da região constante. Os anticorpos monoclonais humanos são preferíveis para determinadas aplicações, especialmente para o diagnóstico in vivo e para a terapia de seres humanos de modo a minimizar o seu reconhecimento como corpos estranhos pelo sistema imunológico do paciente.

Embora as imunoglobulinas de murino e de seres humanos sejam as mais vulgarmente produzidas também se podem utilizar anticorpos monoclonais ou suas porções, originados noutras espécies, por exemplo, lagomorfos, bovinos, ovinos, equinos, suínos, aves e semelhantes. Deverá ter-se em consideração que as técnicas para a produção de anticorpos monoclonais e as técnicas de engenharia genética evoluíram de tal modo que é possível fazer-se o intercâmbio entre as sequências do anticorpo de uma determinada espécie com as sequências de um anticorpo de outras espécies. Deste modo, e tal como se utiliza na presente invenção, a designação anticorpo "humano" refere-se a um anticorpo que é efectivamente humano na sua origem mas que também pode conter algumas sequências não humanas e/ou não imunoglobulínicas.

De modo idêntico, no que se refere à imunoglobulina, que na presente invenção se utiliza como sinónimo de anticorpo, deverá ter-se em atenção que algumas sequências não imunoglobulínicas se podem encontrar presentes

na molécula embora retendo a capacidade de se fixar ao antigénio. O termo imunoglobulina designa a totalidade das imunoglobulinas e os seus fragmentos de fixação.

Os anticorpos utilizados para homoconjugação podem ser substancialmente mono-específicos, isto é, preparações relativamente puras de anticorpos essencialmente homogéneos obtidos a partir de anti-soros policlonais ou podem ser anticorpos monoclonais. Obtêm-se os anticorpos monoclonais que se fixam a um desejado antigénio ou a um seu epítope a partir da linha de células que os segrega. Pode isolar-se a linha de células produtoras de anticorpos a partir das células B de diversas espécies utilizando técnicas convencionais de fusão, de transformação viral ou outras técnicas de imortalização conhecidas pelo especialista. Podem originar-se, por exemplo, anticorpos monoclonais humanos utilizando técnicas de transformação do vírus de Epstein-Barr (VEB), técnicas de fusão do hibridoma ou associação das mesmas. Ver, por exemplo, Kozbor e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79 (1982), 6651 e as patentes de invenção norte-americanas N<sup>os</sup> 4 464 465 e 4 624 921, que aqui se incoorporam a título de referência. A designação "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo produzido por uma linha de células clonais imortalizada, separadas das células produtoras de anticorpos com uma especificidade de fixação antigénica diferente. Deste modo, os referidos anticorpos

monoclonais produzem-se e isolam-se a partir de outros anticorpos monoclonais e, de acordo com o anteriormente exposto, numa forma praticamente pura (relativamente aos outros anticorpos) e segundo uma concentração geralmente superior à existente normalmente nos soros das espécies animais que servem como fonte de células B.

Assim, deverá considerar-se que a presente invenção não se limita à especificidade de fixação antigénica dos homoconjugados particulares que aqui se exemplificam mas também pode ser utilizada no tratamento de diversas doenças associadas a antigénios, especialmente àqueles para as quais os anticorpos monoclonais têm sido terapêuticamente administrados. Por doença associada ao antigénio deverá entender-se uma doença cuja manifestação coincida com a presença clínica de um antigénio estranho (por exemplo, bactérias, vírus ou antigénios de tumor ou associados a tumor) ou auto-antigénios (como nos casos das doenças de autoimunidade). Foi descrita uma grande variedade de anticorpos monoclonais na literatura técnica e na literatura referente às patentes de invenção, muitas das quais se encontram publicamente disponíveis nos depósitos de células como, por exemplo, na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Parkville, MD 20852, cujo catálogo, ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybriomas, 6<sup>a</sup> ed. 1988, se incorpora aqui a título de referência. Exemplos representativos de anticorpos monoclonais encontram-se des

critos, por exemplo, nas patentes de invenção norte-americanas N<sup>o</sup>s 4 596 769, 4 689 299, 4 753 894, 4 834 975, 4 834 976, 4 925 800 e 4 958 009, que se incorporam aqui a título de referência. Os métodos descritos na presente invenção possibilitam a produção de novos homoconjugados ligados por ligação cruzada, a partir de imunoglobulinas obtidas a partir dessas linhas de células.

Poderão produzir-se as imunoglobulinas homoconjugadas e quimicamente ligadas, por conjugação química de anticorpos, utilizando procedimentos laboratoriais bem conhecidos assim como utilizando reagentes para ligação cruzada. Por "quimicamente ligadas" pretende-se referir que as moléculas de imunoglobulina foram unidas por síntese, isto é, não foram produzidas por uma célula, estando ligadas umas às outras por ligações covalentes. O método preferencial de conjugação consiste na formação de pelo menos uma ligação covalente entre as moléculas de imunoglobulina.

As moléculas de imunoglobulina podem formar complexos ou ligarem-se quimicamente umas às outras segundo diversos procedimentos de ligação química bem conhecidos na especialidade. As regiões Fc ou Fab podem servir como sítio de ligação. A ligação pode ser directa, o que engloba as ligações que contêm um grupo de ligação de síntese, ou indirectas, significando isto uma ligação que possui um parte interveniente, tal como uma proteína ou um pép-

tido, por exemplo, a albumina plasmática ou outras moléculas separadoras. Pode efectuar-se a ligação, por exemplo, através de ligantes reticulares heterobifuncionais ou homobifuncionais, por exemplo, a carbodiimida, o glutaraldeído, 3-(2-piridilditio)-propionato de N-succinimido (SPDP) e os seus derivados, a bis-maleimida, ciclohexano-1-carboxilato de 4-(N-maleimidometilo) (SMCC), ligação cruzada sem ligantes reticulares exógenos através de grupos reactivos com as moléculas individuais, tais como grupos hidratos de carbono, dissulfureto, carboxilo ou amino através de oxidação ou redução da proteína nativa ou através do tratamento com uma enzima ou um seu similar. Os métodos para a ligação cruzada química das moléculas de anticorpo são geralmente conhecidos na especialidade, encontrando-se descritos diversos agentes hetero- e homobifuncionais, por exemplo, nas patentes de invenção norte-americanas N<sup>o</sup>s 4 355 023, 4 657 853, 4 676 980, 4 925 921 e 4 970 156 e por Harlow e Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor, Press, 1988 e ImmunoTechnology Catalogue and Handbook, Pierce Chemical Co., 1989, cujo conteúdo se encontra aqui incorporado por referência. Regra geral, estas ligações cruzadas de síntese não deverão afectar substancialmente a região de fixação do antigénio das moléculas nem as funções efectoras pretendidas.

Pode efectuar-se a detecção e purificação das imunoglobulinas do homoconjugado de acordo com diversas técnicas em que se inclui a cromatografia líquida e por afinidade, a centrifugação em gradiente e a electroforese sobre gel, entre outras. A actividade acrescida dos homoconjugados pode ser calculada por meio de ensaios de ligação quantitativa do antigénio, ensaios de competição do anticorpo, ensaios de opsonofagocitose, ensaios de citotoxicidade dependente do complemento, e similares. Estas tecnicas são familiares para qualquer especialista e foram descritas, por exemplo, por Harlow e Lane, supra.

As preparações de anticorpos homoconjugados com uma capacidade de ligação acrescida serão igualmente úteis no tratamento e diagnóstico de diversas situações que aqui se referem como doenças associadas a antigénios. Os homoconjugados oferecem características de diagnóstico e terapêuticas significativamente melhorada em comparação com os anticorpos monoméricos não conjugados. Devido à avidéz acrescida dos homoconjugados é actualmente possível, em determinadas circunstâncias, converter um anticorpo IgG previamente não protector ou fracamente protector de modo a ser protector contra infecções ou tumores, por exemplo, ou de modo a que actue como imunomodulador, potenciando ou regulando a reacção imunológica do hospedeiro para um determinado antigénio. No caso de um anticorpo IgG para



um determinado antigénio ou para um determinado epítope do antigénio ser protector e de um anticorpo IgG monomérico não se revelar protector ou ser apenas fracamente protector, um homoconjugado produzido de acordo com os métodos descritos na presente invenção poderá proporcionar uma avidéz suficiente para conferir uma protecção significativa contra as infecções, aniquilamento celular, etc. Por exemplo, o homoconjugado dimérico ou trimérico de IgG pode possuir qualidades terapêuticas anti-infecciosas que podem ser encontradas em determinados anticorpos multivalentes, tais como os IgM, mas pode possuir também qualidades inerentes a monómeros de IgG tais como a sua capacidade para atravessar a placenta, para se ligar aos macrófagos e aos leucócitos PMN, e faltar-lhe um requisito para o complemento mediar a opsonização. Os homoconjugados de IgG podem possuir outros atributos tipicamente associados com as IgG, tais como a sua fácil purificação, maior duração durante o armazenamento e uma maior semi-vida in vivo.

Apesar de as preparações de homoconjugados serem úteis contra determinados alvos, tais como antigénios bacterianos e virais dependendo, como é evidente, da especificidade da região de ligação do antigénio do homoconjugado, serão especialmente úteis nos casos em que se torna necessário o aniquilamento das células de mamíferos. Podem utilizar-se, por exemplo, os homoconjugados no tratamento

de células cancerosas que despoletam antigénios específicos associados ao tumor (como por exemplo os antigénios associados ao tumor da mama ou do pulmão), inibição ou aniquilamento das células de mamíferos infectadas com vírus ou bactérias ou células que expressem antigénios associados com uma doença específica de auto-imunidade. Também se podem utilizar os homoconjugados para se eliminarem células seleccionadas da medula óssea ou na imunossupressão de receptores nas transplantações, etc.

Como é evidente, a presente invenção não se limita aos homoconjugados de anticorpos que oferecem protecção ou exibem outros atributos funcionais in vivo como abrange também o aumento de avidéz, o que torna possível, uma série de procedimentos de diagnóstico que, de outro modo talvez não fossem praticáveis com um monómero bivalente de baixa afinidade e/ou de baixa avidéz.

Pode determinar-se a capacidade dos anticorpos resultantes para inibir um tumor, tal como um tumor da mama ou do pulmão, para actuarem como imunodeladores ou para oferecerem protecção contra o estímulo provocado por um agente patogénico, por exemplo, de acordo com diversos sistemas in vitro e in vivo que são do conhecimento do especialista. No Exemplo III a seguir descrito apresenta-se um protocolo exemplificativo para a protecção contra a infecção pela E. coli K1, em que se utiliza um anticorpo



homoconjugado que não conferia protecção ou conferia apenas uma fraca protecção, como uma IgG.

Os novos homoconjugados de anticorpos monoclonais e as composições farmacêuticas preparadas a partir dos mesmos são especialmente úteis quando administrados no tratamento profilático e/ou terapêutico de uma doença associada a um antigénio. Pode administrar-se a composição farmacêutica, de preferência, por via parenteral, isto é, por via sub-cutânea, intramuscular ou intravenosa, ou por via oral. Deste modo, a presente invenção proporciona composições para administração parenteral constituídas por uma solução de preparações de anticorpos monoclonais homoconjugados ou por uma mistura de anticorpos monoméricos e homoconjugados dissolvidos num veículo aceitável, de preferência, um veículo aquoso. Podem utilizar-se diversos veículos aquosos como, por exemplo, água, água tamponada, solução salina a 0,4 %, glicina a 0,3 % e similares. Estas composições podem ser esterilizadas de acordo com as técnicas de esterilização convencionais e bem conhecidas. As composições podem conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis necessárias para fazer a aproximação das condições fisiológicas, tais como agentes para ajustamento do pH e agentes tamponantes, agentes para ajustamento da toxicidade e similares, como por exemplo, o acetato de sódio, o lactato de sódio, o cloreto de sódio, o cloreto de potássio, o cloreto de cálcio,

etc. A concentração de anticorpo nestas formulações pode variar amplamente, isto é, entre um valor inferior a 0,5 % e normalmente igual ao próximo de 1 % até um valor da ordem de 15 ou 20 % em peso e será seleccionada fundamentalmente pelos volumes de fluídos, viscosidades, etc., de acordo com o modo específico de administração seleccionado, como a situação que se pretende tratar, por exemplo, uma doença infecciosa, tal como uma infecção por estreptococos do grupo B ou por E. coli, um tumor, tal como o carcinoma da mama, etc., e de acordo com o indivíduo que se pretende tratar, isto é, se é um adulto, uma criança ou um recém-nascido.

Deste modo, uma composição farmacêutica típica para infusão intravenosa e para tratar uma infecção num adulto, deverá ser preparada de modo a conter 250 ml de solução de Ringer esterilizada e entre cerca de 100 mg e 10 g de anticorpo. Os métodos actuais para a preparação de compostos administráveis por via parenteral ou oral são do conhecimento dos especialistas e encontram-se descritos mais pormenorizadamente, por exemplo, em Remington's Pharmacal Science, Easton, P.A., Mack Publishing Company, 16ª ed. 1982, que aqui se incorpora por referência.

As composições que contêm os anticorpos homoconjugados da presente invenção ou uma mistura dos mesmos podem ser administradas para fins profilácticos e/ou terapêuticos. As aplicações terapêuticas administram-se

as composições a um paciente, que já sofra de uma doença, numa quantidade suficiente para curar ou pelo menos interromper parcialmente a doença ou as suas complicações. Uma quantidade adequada para atingir esta finalidade define-se como "uma dose terapêuticamente eficaz". As quantidades eficazes para esta finalidade dependerão da gravidade da doença, isto é, se se trata de uma infecção, de um tumor, etc., da idade do paciente e do estado geral do sistema imunológico do referido paciente.

De um modo geral, as quantidades variarão entre cerca de 0,1 e cerca de 50 mg de anticorpo por quilograma de massa corporal, por dose, sendo mais comum utilizarem-se dosagens compreendidas entre 5 e 25 mg de anticorpo por quilograma, por paciente. Os materiais da presente invenção podem geralmente ser utilizados em estados graves de doença, isto é, em situações de risco de vida ou situações de risco de vida ou situações de potencial risco de vida. Em tais casos, tendo em vista a minimização de substâncias exteriores e a possibilidade de reações menores a "substâncias estranhas" que podem ocorrer quando se administra, por exemplo, anticorpos homoconjugados eologénicos ou anticorpos monoconjugados quiméricos que a presente invenção torna viável, é possível e desejável que o médico assistente administre quantidades bastante excessivas dos referidos anticorpos.

Nas aplicações profiláticas administram

-se as composições contendo os anticorpos da presente invenção, ou as misturas dos mesmos, a um paciente que não se encontre ainda num estado de doença, de modo a aumentar a resistência do paciente. Esta quantidade define-se como " a dose profilacticamente eficaz". Neste caso, as quantidades exactas dependerão mais uma vez, do estado de saúde do paciente e do nível geral de imunidade, mas variarão geralmente entre 0,1 e 25 mg por quilograma, especialmente entre 0,5 e 2,5 mg por quilograma. Uma utilização profiláctica preferida consiste no tratamento de fetos e de recém-nascidos em risco de infecção através das suas próprias mães. Quando o tratamento depende da passagem através da placenta, pode ser necessário ajustar a dosagem de modo a reflectir a percentagem de anticorpo que é capaz de passar através do sangue da mulher grávida para o feto.

Podem efectuar-se administrações simples ou múltiplas das composições, sendo os níveis de dose e as normas prescritas pelo médico assistente. Em qualquer dos casos, as formulações farmacêuticas deverão proporcionar uma quantidade de anticorpo homoconjugado suficiente para tratar o paciente.

Os anticorpos homoconjugados da presente invenção também podem ter diversas utilizações in vitro. A título de exemplo, os anticorpos homoconjugados de IgG, referidos no Exemplo I seguinte podem ser utilizados para a

detecção da presença de estreptococos do grupo B ou de E. coli K1, para preparação de vacinas ou similares.

Para diagnóstico in vitro, os anticorpos podem encontrar-se marcados ou não marcados. Os anticorpos humoconjugados não marcados utilizam-se especialmente nos ensaios de aglutinação ou podem ser utilizados em combinação com outros anticorpos marcados (anticorpos secundários) que reagem com os anticorpos homoconjugados, tais como os anticorpos específicos para as regiões Fc. Em alternativa pode marcar-se directamente o anticorpo. Pode utilizar-se uma ampla diversidade de agentes marcadores, tais como os radionuclidos, partículas (como, por exemplo, ouro, ferritina, partículas magnéticas, eritrócitos), flúor, enzimas extractos enzimáticos, cofactores enzimáticos, inibidores de enzimas, ligandos (especialmente os haptenos), etc.. Encontram-se disponíveis numerosos tipos de ensaios imunológicos que são do conhecimento dos especialistas, tais como os ensaios intercalados e os competitivos que se encontram descritos, por exemplo, na patente de invenção norte-americana Nº 4 376 110, que aqui se incorpora por referência, e descritos por Harlow e Lane, supra.

Também se fornecem estojos que contêm os anticorpos que constituem o objectivo da presente invenção que poderão ser utilizados na protecção ou na detecção da presença de um determinado antigénio seleccionado. Deste

modo, as composições de anticorpos que constituem o objetivo da presente invenção podem ser proporcionadas habitualmente numa forma liofilizada num recipiente, quer isoladamente quer em conjugação com anticorpos adicionais. Os anticorpos que podem ser conjugados com um marcador ou com uma toxina, ou não conjugados, são incluídos nos estojos com tampões, tais como Tris, fosfato, carbonato, etc., estabilizantes, biocidas, proteínas inertes, por exemplo, albumina sérica ou similares, contendo ainda esse estojo de instruções para utilização. De um modo geral, estes materiais encontrar-se-ão presentes numa percentagem inferior a cerca de 5 % em peso, com base na quantidade de anticorpo activo e encontram-se habitualmente presentes numa quantidade total inferior a cerca de 0,0001 % em peso, com base na concentração do anticorpo. Frequentemente é aconselhável que se encontre incluído um excipiente ou carga inerte para diluir os ingredientes activos, devendo o excipiente encontrar-se presente numa percentagem que varie aproximadamente entre 1 e 99 % da composição total. Quando num ensaio se utiliza um segundo anticorpo capaz de se ligar aos anticorpos homoconjugados, este encontrar-se-à presente num frasco separado. O segundo anticorpo encontra-se habitualmente conjugado com um marcador e formulado de modo análogo às formulações de anticorpos anteriormente descritas.

Os exemplos que se seguem têm apenas uma finalidade ilustrativa, não devendo de modo algum limitar o âmbito da presente invenção.

### EXEMPLO I

#### Preparação de homoconjugados de anticorpos monoclonais

Neste exemplo indicam-se meios para a preparação de homoconjugados de diversos anticorpos monoclonais representativos para a selecção de antigénios bacterianos e de tumores. Os homoconjugados foram depois testados em ensaios funcionais descritos nos exemplos seguintes.

Prepararam-se homoconjugados dos seguintes anticorpos monoclonais: anticorpo monoclonal D3, um anticorpo de IgG<sub>1</sub> humana que se fixa aos hidratos de carbono do grupo B dos estreptococos do grupo B.5E1-G, um anticorpo monoclonal de IgG<sub>1</sub> humana que se liga ao hidrato de carbono capsular da E. coli K1. BR64, um anticorpo monoclonal de IgG<sub>1</sub> de murino que se liga ao antigénio associado ao carcinoma humano incluindo os carcinomas do cólon, da mama, do ovário e do pulmão. O anticorpo BR64 encontra-se depositado na American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville M.D., sob o número de depósito ATCC Nº HB 9895. O anticorpo BR96 que também se encontra depositado na American Type Culture Collection, sob o número de depósito ATCC Nº HB 10036 e que é um anticorpo monoclonal quimérico de IgG humana -IgG de murino que se liga aos antigénios associados ao tumor do pulmão e ao tumor da mama.



Prepararam-se os homoconjugados de cada um dos anticorpos utilizando maleimido-butiriloxi-succinimida e iminotiolano, de acordo com o protocolo descrito a seguir. Efectuou-se a diálise dos anticorpos (1 mg/ml) durante a noite na presença de um tampão de acoplamento ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M dibásico, hepta-hidratado, NaCl 0,1 M, pH 7,5). Tiolou-se a ml de anticorpo adicionando sob agitação cloridrato de 2-aminotiolano (Pierce Chemical Co.), 50  $\mu\text{l}$  (0,5 mg) de uma solução de 2-iminotiolano (10 mg/ml em tampão de acoplamento). Tratou-se uma segunda alíquota de anticorpo (1 ml) com N- $\gamma$ -maleimido-butiriloxi-succinimida (GMBS) (Calbiochem, La Jolla, CA) 5  $\mu\text{l}$  (14  $\mu\text{g}$ ) de solução de GMBS (1 mg em 360  $\mu\text{l}$  de dimetilformamida (DMF)). Cada uma das alíquotas tratadas de anticorpo foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente e depois verteram-se os anticorpos em coluna PD-10 (Pharmacia) previamente equilibrada com tampão de acoplamento. Após um volume total vazio de 2,6 ml, recolheram-se os anticorpos no dobro do volume original. Misturou-se então as alíquotas de anticorpos tratadas com GMBS e as alíquotas de anticorpos tioladas e efectuou-se a incubação à temperatura ambiente durante 5 horas. Interromperam-se as reacções adicionando 1  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) 25 mM (1  $\mu\text{l}$  em 560  $\mu\text{l}$  de tampão de acoplamento) e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Interrompeu-se a adição de  $\beta$ -ME e adicionou-se 11  $\mu\text{l}$  (11  $\mu\text{g}$ ) de N-etilmaleimida (Sigma Chemical Co., St. Louis) na concentração de 1 mg/ml em DMF. Efectuou-se a diálise das prepara-



ções de homoconjugados, durante a noite, em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e procedeu-se à separação por cromatografia de exclusão dimensional recorrendo às técnicas de FPLC Superose-6 e Superose-12 (Pharmacia, Uppsala Suécia). Na Fig. 1 apresentam-se os cromatogramas das colunas de FPLC para os anticorpos monoclonais D3, 5E1-G e BR64.

## EXEMPLO II

### Actividade de Ligação dos Homoconjugados

Comparou-se a capacidade dos homoconjugados dos anticorpos monoclonais tetravalentes e hexavalentes para se ligarem a antigénios com a capacidade de ligação de anticorpos monoméricos de IgG bivalente. Mediu-se a ligação dos homoconjugados anti-GBS na presença da estirpe GBS (I334) ligada em cavidades de microtitulação utilizando poli-L-lisina (PLL). Comparou-se as concentrações equivalentes de proteína equivalentes do monómero D3 do anticorpo não tratado, com as dos homoconjugados diméricos e triméricos de IgG fraccionados por FPLC. Efectuou-se o ensaio de ligação com anticorpos específicos anti-cadeia gama humana, marcados com biotina. Os resultados encontram-se indicados na Fig. 2 onde pode verificar-se que as actividades relativas de ligação das preparações de homoconjugados diméricos ou triméricos eram significativamente superiores às do monómero inicial de IgG.

Para sedeterminar a ligação dos homocon-

jugados de anticorpos anti-E.coli K1, ligou-se a estirpe H16 de E.coli a cavidades de microtitulação utilizando poli-L-lisina. Efectuou-se a comparação do anticorpo 5E1-G, não tratado, com os homoconjugados diméricos e triméricos de IgG, preparados tal como anteriormente se descreveu. Fez-se reagir concentrações equivalentes de proteína dos anticorpos com a E. coli. Efectuou-se o ensaio de ligação com anticorpos específicos anti-cadeia gama humana, marcados com biotina. Na Fig. 3 indicam-se os resultados podendo verificar-se que as actividades relativas de ligação das preparações de homoconjugados diméricos e triméricos eram significativamente superiores à do monómero inicial de IgG.

Para se determinar a capacidade do anticorpo BR64, anti-tumor da mama e dos seus homoconjugados, desenvolveu-se uma linha de células de tumor da mama, 3396 em cavidades de microtitulação. Efectuou-se a comparação do anticorpo BR64 não tratado, com os homoconjugados diméricos e triméricos de IgG. Fez-se reagir concentrações equivalentes de proteína dos anticorpos com as células de tumor da mama. Efectuou-se o ensaio com anticorpos específicos anti-cadeia gama de murino marcados com biotina. Na Fig. 4 iniciam-se os resultados, sendo possível verificar-se que as actividades relativas de ligação das preparações de homoconjugados diméricos e triméricos eram significativamente superiores à do monómero inicial de IgG.

Para se determinar a fixação dos anticor-

pos anti-tumor da mama e anti-tumor do pulmão, utilizaram-se como alvos duas linhas de células da mama (H3396 e H3760B) e duas linhas de células do pulmão (H2987 e H2707). Ligaram-se células recentemente tratadas com tripsina a placas de microtitulação utilizando PLL e o protocolo ELISA de acordo com a descrição que se segue. Diluiu-se PLL até uma concentração de 1  $\mu\text{g/ml}$  em PBS e efectuou-se a adsorção em placas de microtitulação de 96 cavidades da Immulon, operação essa que se realizou incubando a solução de PLL à razão de 75  $\mu\text{l}$ /cavidade durante 1 hora e à temperatura ambiente. As linhas de células de carcinoma (cultivadas em IMDM com 15 % de FCS) foram tratadas com tripsina, lavadas duas vezes e efectuada nova suspensão das mesmas em PBS numa concentração de  $2 \times 10^5$  células/ml. As placas com PLL tratadas de acordo com o protocolo ELISA foram tratadas 3 vezes com uma mistura de solução salina/Tween (efectuaram-se todos os passos de lavagem com um sistema de lavagem de escoamento por gravidade). Adicionou-se a suspensão celular à razão de 100  $\mu\text{l}$ /cavidade (cerca de 20 000 células/cavidade) e incubou-se durante 1 hora à temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ . Lavaram-se então as placas 3 vezes com uma mistura de solução salina/Tween. Diluíram-se os anticorpos num diluente característico da espécie (leite desnatado em pó a 5 %, 100  $\mu\text{l}$ /l de espuma A, timerosal, a 0,01 % p/v em PBS), que depois se adicionou às placas ELISA (100  $\mu\text{l}$ /cavidade) e efectuou-se

a incubação durante 1 hora à temperatura ambiente. A seguir à incubação lavou-se três vezes as placas com uma mistura de solução salina/Tween e utilizou-se como reagente do segundo passo, anti-IgG humana ou de murganho (Tago) conjugada na cabra com peroxidase e diluída num diluente característico da espécie (100 µl/cavidade) e incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente. Depois lavou-se as placas 5 vezes com uma mistura de solução salina/Tween e adicionou-se tetrametilbenzidina (TMB) cromogénio (TMB), diluído a 1:100 em substrato tamponado, (100 µl/cavidade), tendo-se depois incubado as placas durante 20 minutos. Interromperam-se as reacções adicionando  $H_2SO_4$  3N à razão de 100 µl/cavidade e efectuou-se a leitura das placas segundo dois comprimentos de onda 450/630 nm.

Efectuou-se a comparação dos anticorpos monoclonais BR96 não tratados, com os dímeros de homoconjugados de IgG de BR96 utilizando concentrações proteicas do anticorpo aproximadamente equivalentes. Os resultados apresentados na Fig. 5A-D, para cada uma das linhas de células tumorais ensaiadas indicam que a actividade de ligação relativa na presença das quatro linhas de células tumorais devida à preparação homoconjugada predominantemente dimerica era superior à actividade do monómero inicial de IgG de Br96.

### EXEMPLO III

#### Actividade Acrescida dos Homoconjugados In Vitro

Para se determinar a eficácia in vivo dos homoconjugados dos anticorpos monoclonais para GBS, efectuou-se o ensaio de opsonofagocitose in vitro. Ensaíram-se os homoconjugados para E. coli K1 no que se refere à sua actividade funcional, de acordo com dois tipos de ensaios de opsonização que se descrevem a seguir. Ensaíram-se os homoconjugados de BR64 quanto à sua função in vitro, num ensaio de citotoxicidade dependente do complemento e ensaiaram-se os homoconjugados de BR96 num ensaio de citotoxicidade independente do complemento.

#### Opsonização de GBS pelos Homoconjugados de D3

Efectuaram-se os ensaios de opsonofagocitose, no que se refere a GBS, do seguinte modo: prepararam-se as bactérias inoculando 10 ml de caldo triptico de soja (CTS) com 50 µl de um caldo de cultura, durante uma noite. Incubaram-se os tubos a 37°C num misturador, durante 3 horas, após o que se centrifugou 1,5 ml da cultura durante 1 minuto a 10 000 x g, tendo-se posto de parte o meio de cultura exausto e efectuando nova suspensão do sedimento em 3,5 ml de solução salina de Hank equilibrada que continha 0,1 % de gelatina e HEPES 5 mM (HBSS/Gel). Ajustaram-se as concentrações bacterianas para aproximadamente  $3 \times 10^4$  bactérias/ml, de

acordo com as determinações efectuadas a uma D.O.<sub>600</sub> e efectuando as diluições adequadas (aproximadamente 1 : 50 000). Isolaram-se os neutrófilos humanos de acordo com Van Furth e Van Zwet ("In Vitro Determination of Phagocytosis and Intracellular Killing by Polymorphonuclear and Mononuclear Phagocytes", in Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir, ed., Oxford Blackwell Scientific Publication, 2ª edição, Vol. 2, 1973, 36.1 - 36.24, embora se tivessem efectuado diversas modificações. A película amarelada resultante de 5 ml do sangue heparinizado, diluído a 1:2 em PBS, ficou subjacente ao meio de separação de linfócitos e foi centrifugada. Lavou-se o sedimento de glóbulos vermelhos (GV) uma vez, com meio RPMI 1640 e voltou a efectuar-se nova suspensão num volume igual de PBS a 37°C. Adicionou-se 25 ml desta suspensão a 25 ml de dextrano a 2% (em PBS a 37°C) e misturou-se total e suavemente. Decorrido um período de incubação de 20 minutos a 37°C, para permitir que os GV sedimentassem, removeu-se o sobrenadante (contendo neutrófilos, lavou-se duas vezes em PBS a 4°C, uma vez em HBSS/Gel e efectuou-se a sua suspensão no mesmo meio numa concentração de  $5 \times 10^7$  neutrófilos/ml. Para fonte do complemento utilizada com GBS, fez-se absorver o soro humano três vezes com bactérias vivas [Bjornson, A. B. e Michael, J.B., J. Inf. Dis., 130 Suppl : S119-S126 (1974)] correspondentes aos organismos utilizados no ensaio.

Para o ensaio, introduziu-se em micro-



tubos de ensaio esterilizados de centrífugadora, feitos de propileno e com uma capacidade de 1,5 ml, uma quantidade de 250  $\mu$ l de preparação de anticorpo (homoconjugados ou monómeros de ensaio) em soro de vitela fetal a 10 % em HBSS/gel com HEPES e 100  $\mu$ l de suspensão bacteriana (cerca de  $3 \times 10^4$  bactérias/ml). Decorridos 30 minutos a 37°C adicionou-se 150  $\mu$ l de solução contendo 75  $\mu$ l do complemento, 51  $\mu$ l de neutrófilos ( $5 \times 10^7$  ml) e 25  $\mu$ l de HBSS/gel. Incubaram-se as misturas num dispositivo rotativo durante 60 minutos a 37°C, após o que se colocaram numa mistura de água e gelo. Decorridos 10 minutos adicionou-se 20  $\mu$ l de cada um destes tubos a uma placa de Petri de 100 mm que continha 3 ml de agarose solidificada contendo caldo triptico de soja a 0,5 %, seguindo-se a incubação a 37°C. Decorridas 18 horas determinou-se o número de colónias e considerou-se os dados como unidades de formação de colónias (UFC) em cada uma das situações.

Os resultados referentes aos homoconjugados de D3 encontram-se indicados na Fig. 6 onde se verifica que os dímeros e trímeros necessitavam de muito menos quantidade de anticorpo, expresso em nanogramas de proteína, para opsonizar a estirpe GBS ensaiada, em comparação com o monómero inicial de IgG.

Com mais um dado da eficácia in vivo dos homoconjugados preparados com um anticorpo monoclonal

adicional para o hidrato de carbono do grupo B de GBS [D3, produzido conforme descrito por Raff e colaboradores., J. Infect. Dis., 163 (1991) 346 e na publicação da patente de invenção PCT WO 91/06305, que aqui se incluem a título de referência] testou-se os ensaios de opsonofagocitose in vitro duas estirpes de GBS, M94 e I334. Na Fig. 7 indicam-se os resultados do ensaio verificando-se claramente que os homoconjugados de D3 anti-GBS originavam uma maior opsonização do que os isolados clínicos de GBS humano. Estes resultados sugerem novamente que os homoconjugados aumentam significativamente a actividade de protecção in vivo dos anticorpos em comapração com a dos anticorpos monoclonais monoméricos de IgG iniciais.

#### Opsonização de E. coli K1 pelos Homoconjugados de 5E1-G

Para se isolarem os neutrófilos humanos colocou-se em camadas o sangue humano heparinizado (5 ml) sobre 3,0 ml de Meio de Resolução Mono-Poli (MPRM, Flow Labs) em tubos de poliestireno e centrifugou-se durante 30 minutos a 300 x g à temperatura ambiente. Após a centrifugação evidenciavam-se três camadas celulares, contendo a camada média neutrófilos. Removeu-se e eliminou-se o soro e a camadacelular superior recolheram-se os neutrófilos e adicionaram-se a um tubo de 50 ml que continha PBS previamente aquecido. Centrifugaram-se os neutrófilos durante 10 minutos a 300 x g, à temperatura ambiente, eliminou-se o sobrenadante, preparou-se nova



suspensão celular do sedimento em 10 ml de meio de cultura de tecidos (RPMI-1640) contendo 0,5 % de gelatina e ajustou-se a concentração celular para  $5 \times 10^6$  células/ml.

Efectuaram-se os ensaios do seguinte modo: adicionou-se a tubos de luminometria (LKB Nuclear) 100  $\mu$ l de uma mistura contendo o homoconjugado de ensaio (5E1-G) ou o monómero do anticorpo monoclonal IgG de controlo, para P. aeroginosaflagela, 100  $\mu$ l de uma suspensão bacteriana em fase de crescimento exponencial ( $DO_{660} = 0,02$ ) e 100  $\mu$ l de complemento de soro humano diluído absorvido em bactérias, numa concentração final de 3,3 %. Descongelou-se o complemento imediatamente antes de ser utilizado e acrescentou-se 5  $\mu$ l de  $CaCl_2$  2M/ml. Colocaram-se os tubos num dispositivo de luminometria LKB previamente aquecido, o que permitiu a utilização de 24 tubos num ciclo de leitura contínuo. Decorridos 30 minutos, durante os quais se aqueceram os tubos e periodicamente se agitaram, adicionou-se 100  $\mu$ l de neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml) e 600  $\mu$ l de Luminol  $10^{-4}$  M em Solução Salina Equilibrada de Hank. Deu-se início a sessões de contagem durante 25 ciclos contínuos, o que correspondia, sensivelmente a 80 minutos para 24 tubos de amostra. Determinou-se a intensidade de quimioluminiscência em milivolts (mV), sendo

valor em mV para os tubos que continham o anticorpo de ensaio

sinal : ruído = -----  
número médio de tubos que continham o anticorpo negativo

Na Fig. 8 apresentam-se os resultados dos ensaios em que se torna evidente que os homoconjugados originam uma maior opsonização dos organismos E. coli, do que os monómeros iniciais de IgG. Os homodímeros e homotrímeros de 5E1-G possuem uma capacidade de opsonização significativamente maior do que a forma monomérica de IgG de 5E1-G. Uma vez que os ensaios de opsonofagocitose proporcionam uma previsão específica da capacidade, in vivo, para conferir protecção a animais (ver, por exemplo, patente de invenção norte-americana Nº 4 970 070, que aqui se incorpora por referência), estes resultados sugerem que os homoconjugados diméricos e triméricos aumentarão significativamente as actividades de protecção in vivo dos anticorpos, por comparação com os anticorpos monoméricos IgG iniciais.

Para se obter uma melhor confirmação da eficácia in vitro e, como tal, da actividade in vivo dos homoconjugados de anticorpos monoclonais em relação à E. coli K1, ensaiaram-se estes mesmos anticorpos num ensaio de opsonofagocitose, in vitro, tal como anteriormente descreveu, na

presença de duas estirpes adicionais de E. coli K1, H16 e A14. Tal como se indica na Fig. 9, os homoconjugados anti-E. coli K1 originaram uma maior opsonização dos isolados clínicos humanos, o que sugere que as preparações predominantemente constituídas por homoconjugados diméricos aumentam significativamente a actividade de protecção in vivo dos anticorpos monoclonais anti-E. coli K1.

#### Citotoxicidade Dependente do Complemento dos Homoconjugados de BR64

Também se utilizaram ensaios funcionais in vitro para demonstrar a maior actividade funcional dos anticorpos monoclonais homoconjugados para antigénios anti-tumor. Para se ensaiarem os homoconjugados de BR64, as células do tumor alvo (H3630) foram marcadas com  $^{51}\text{Cr}$ , incubando-as numa proporção de  $1 \times 10^6$  células/0,3 ml de meio de cultura de tecido em 100  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de  $\text{CO}_2$  a 6 %. Após lavagem para remover o excesso de  $^{51}\text{Cr}$ , adicionaram-se  $2 \times 10^4$  células marcadas em 67  $\mu\text{l}$  de meio (RPMI-1640 mais soro de feto de bovino a 15 %) por cavidade de placa de microtitulação. Em seguida, adicionou-se às cavidades em duplicado 67  $\mu\text{l}$  do número de ensaio (BR64), do monómero de controlo negativo (Mab 96.5) ou do anticorpo monoclonal homoconjugado (dímero), diluídos de um modo adequado. Finalmente, adicionou-se 67  $\mu\text{l}$

de complemento de soro humano, descongelado recentemente, a cada uma das cavidades, cobriram-se as placas com parafina e incubaram-se a 37°C durante 4 horas. Após incubação centrifugaram-se as placas a 400 x g durante 10 minutos e removeu-se 100 µl de sobrenadante de cada uma das cavidades e colocou-se em tubos de poliestireno de 12 x 75 mm. Submeteu-se os tubos a contagem num contador gama. Em todos os ensaios foram incluídos os seguintes elementos de controlo:

QUADRO I

Cavidade	Meio	Soro	Anticorpo Diluído	Célula Alvo
Libertação espontânea	134 <sup>δ</sup>	-	-	67
Toxicidade do Complemento	67	67	-	67
Incorporação total	134	-	-	67
Libertação máxima*	67	-	-	67
Apenas anticorpo	67	-	67	67

<sup>δ</sup> As quantidades encontram-se expressas em µl/  
/cavidade.

⌘ Antes de se fazer a incubação da mistura de ensaio, eram estas as unicas cavidades que continham uma quantidade inferior a 201  $\mu$ l devido ao facto de se lhes ter adicionado posteriormente 67  $\mu$ l de Triton X-100 para se efectuar a lise das células alvo marcadas.

Determinou-se a percentagem de aniquilamento (% de aniquilamento) a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{[\text{Ensaio (CPM médio)} - \text{controlo Hc' (CPM médio)}]}{\text{Incorporação total [CPM médio - controlo Hc' (CPM médio)]}} \times 100 = \% \text{ de aniquilamento}$$

em que CPM representa o número de unidades de contagem por minuto em valor médio das amostras em duplicado obtidas após determinação efectuada com o contador gama e Hc' representa o controlo de Toxicidade do Complemento.

Os resultados dos ensaios encontram-se indicados na Fig. 10 onde se torna evidente que o homoconjugado de BR64 originou um aniquilamento das células alvo do tumor 8 vezes superior ao aniquilamento originado pelo monómero inicial de IgG de BR64. Mediante o ensaio CDC é possível geralmente prever-se a capacidade in vivo de protecção contra os tumores dos animais. Estes resultados

sugerem que os homoconjugados aumentarão significativamente a utilidade destes anticorpos in vivo contra os tumores, especialmente em comparação com os anticorpos monoméricos IgG iniciais.

Citotoxicidade Acrescida Independente do Complemento de Homoconjugados de BR96 Quiméricos

Misturou-se células alvo do tumor (H3396) numa quantidade de  $5 \times 10^5$  células/tubo com 100  $\mu$ l de anticorpo de ensaio e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Recolheram-se as células e misturaram-se com a concentração adequada de iodeto de propídio (Sigma, 10  $\mu$ g/tubo). O iodeto de propídio consiste num corante reactivo com ADN que apenas penetra a membrana das células mortas ou agonizantes. Desse modo, quantificando o número de células fluorescentes na população pode determinar-se o número de células mortas [Helstrom e colaboradores, Cancer Res., 50 (1990) 2183-2190]. Após incubação durante 10 minutos procedeu-se à lavagem das células em meio de cultura de tecidos contendo soro de vitela fetal a 15 %, efectuou-se a sua suspensão no mesmo meio e colocou-se em gelo. Analisaram-se as células quanto à sua fluorescência num aparelho EPICS Fluorescence Activated Cell Sorter que quantifica as células vivas e mortas com base na fluorescência e dimensões (as células pequenas e grandes representam, respectivamente, células mortas e células vivas). Os resultados (Fig. 11) demonstram que os dímeros homoconju

gados de BR96 foram muito mais eficazes no aniquilamento das células do tumor do que o monómero inicial. Estes resultados sugerem que os homoconjugados aumentarão significativamente a utilidade destes anticorpos in vivo contra os tumores.

#### EXEMPLO IV

##### Protecção In Vivo Contra a Infecção por E. coli K1 nos Ratos Recém-Nascidos Utilizando Homoconjugados de IgG

Injectaram-se intraperitonealmente ratos recém-nascidos Sprague-Dawley com uma idade inferior a 48 horas (que ainda viviam com as suas mães) com aproximadamente 72 organismos de E. coli K1 e 2 horas mais tarde foi-lhes ministrado 1 a 5 µg de homoconjugados diméricos de 5E1-G ou 100 µg do anticorpo 5E1-G monomérico ou ainda anticorpos de controlo IgG e IgM. Em todos os ensaios as ratas recém-nascidas foram examinadas diariamente para se verificarem os sintomas e efectuou-se uma estimativa de sobrevivência. Os resultados dos ensaios indicados no Quadro II que se segue demonstram que 5 µg dos homoconjugados diméricos do anticorpo 5E1-G conferiam aos animais uma protecção contra a morte significativamente maior do que a conferida aos animais aos quais tinha sido administrada vinte vezes a quantidade (100 µg) de anticorpo monomérico.

QUADRO II

Protecção Conferida pelos Homoconjugados Contra as  
Infecções provocadas pela E. coli K1

Anticorpo (por rato)	Dose (por rato)	n (rato/grupo)	% de sobreviv. (sobrev/estim.)	valor de p
5E1-IgM	20 ng	26	100 %	<0,001*
5E1-IgG Mon.	100 µg	15	40 %	<0,01
Conj. 5E1- -IgG	5 µg	14	78 %	<0,01
Conj. 5E1- -IgG	1 µg	14	29 %	<0,05
21B8 (Con- trole Nega- tivo)	100 µg	24	0	
S/anticorpo de controlo	-	25	0	

\* Com base na sobrevivência do grupo experimental em função da sobrevivência no grupo de controlo negativo e nos grupos de controlo aos quais não foi administrado qualquer anticorpo.

## EXEMPLO V

### Passagem Transplacental do Anticorpo Homoconjugado para os Fetos das Ratas Grávidas

A capacidade dos homoconjugados do anticorpo IgG para passar através da placenta e atingirem o feto e, deste modo, atingirem subsequentemente a geração seguinte foi comparada com a capacidade do anticorpo monomérico. Utilizou-se como modelo uma rata jovem. Têm sido utilizados modelos idênticos de ratas para se prever a passagem transplacental do anticorpo ou de outras moléculas para fetos humanos. Ver genericamente, Brambell, Frontiers Biol., 18 (1970) 234-276.

Dois ou três dias antes da data prevista para o parto, injectou-se as ratas grávidas por via intravenosa com 40 µg do IgG monomérico de 5E1-G (monómero) (Mães 1 e 2) ou do homoconjugado dimérico de IgG (Mães 3 e 4). Recolheram-se amostras de sangue das mães duas horas após a administração do anticorpo, no dia do parto e também dos ratos recém-nascidos, imediatamente após o nascimento. Em cada uma das amostras de sangue determinou-se a IgG total humana e o anticorpo humano de IgG anti-E. coli K1 utilizando ensaios de fixação quantitativa individualmente concebidos (ELISA). Utilizando anticorpos secundários marcados enzimaticamente e específicos anti-IgG humano, não se detec-



tou IgG da rata nem se interferiu na determinação de IgG humano injectado.

A quantidade de anticorpo que ultrapassou a barreira placentária foi determinada conforme a seguir se descreve.

Acoplou-se o anticorpo anti-cadeia gama humana a placas de microtitulação utilizando tampão de carbonato. Após a adição de amostras diluídas de soro das mães ou dos recém-nascidos ensaiou-se a ligação com anticorpos específicos anti-cadeia gama humana marcados com biotina. Uma vez que um dos grupos de mães tinha recebido apenas anticorpo conjugado, qualquer IgG humana detectada no recém-nascido seria um homoconjugado que teria ultrapassado a barreira placentária.

Os ensaios demonstram que os anticorpos monoméricos e homoconjugados de IgG passaram através da barreira placentária com uma eficácia aproximadamente igual. Assim, o anticorpo monoclonal de IgG homoconjugado seria útil quando administrado profilacticamente a fêmeas grávidas que correem o risco de dar à luz crias mais susceptíveis de desenvolverem uma infecção que pusesse em risco as suas vidas, tal como uma infecção por E. coli K1, no caso desta variante da presente invenção. Estes dados servem também de suporte à utilização dos referidos homoconjugados no tratamento transplacental de diversas outras infecções e tumores.

## EXEMPLO VI

Passagem Transplacental de Anticorpos Monoclonais  
Homoconjugados para os Estreptococos  
do Grupo B

Neste Exemplo demonstra-se a passagem transplacental de anticorpos monoclonais homoconjugados D3.

Efectuaram-se os ensaios, de um modo geral, tal como se descreveu no Exemplo V para o anticorpo monoclonal homoconjugado para a E. coli K1.

Os resultados apresentados no Quadro III seguinte indicam que tanto os anticorpos monoméricos como os homoconjugados de IgG ultrapassaram a barreira placentária.

**QUADRO III:** Passagem Transplacental do Anticorpo Homoconjugado de Ratas Grávidas para os seus Recém-Nascidos

Fonte	Tempo após Injecção	Anticorpo Injectado	
		Homoconjugado	Monómero
Mães	2 horas	1,45 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,3
Mães	3 dias	0,14 ± 0,04	0,11 ± 0,03
(Dia de Parto)			
Crias	Dia de Nascimento	0,41 ± 0,1	0,70 ± 0,2

<sup>a</sup> Concentração de IgG humana no soro de rata (µg/ml)

De acordo com o anteriormente exposto, o anticorpo monoclonal IgG homoconjugado é útil quando administrado profiláctica ou terapêuticamente a fêmeas grávidas susceptíveis de dar à luz recém-nascidos capazes de desenvolver ou que já possuam uma infecção, por exemplo, uma infecção por estreptococos do grupo B ou por E. coli K1. A presente invenção também torna possível a utilização de homoconjugados no tratamento transplacentar de diversas outras infecções e tumores.

#### EXEMPLO VII

##### Protecção In Vivo Contra Infecções por Estreptococos do Grupo B com Homoconjugados de IgG

Neste Exemplo descreve-se a utilização de homoconjugados do anticorpo monoclonal D3 para conferir protecção contra a infecção por estreptococos do grupo B in vivo o que é consistente e vem confirmar os resultados dos ensaios de opsonofagocitose efectuados in vitro.

Tal como se descreveu de um modo geral para os estudos de protecção contra a E. coli K1 referidas no Exemplo IV anterior, injectaram-se intraperitonealmente ratos recém-nascidos com menos de 48 horas de vida (conservados ainda junto das suas mães) com aproximadamente 100 organismos GBS 2 horas após ter-lhes sido administrada uma

injecção intraperitoneal de 20, 4, 0,8 ou 0,2  $\mu$ g de preparações de homoconjugados predominantemente diméricos, 80, 20 ou 4  $\mu$ g de D3 monomérico ou de IgG de controlo. Nos ensaios examinou-se diariamente as ratas recém-nascidas durante sete dias, registou-se os seus sintomas e calculou-se a sua possibilidade de sobrevivência. Os resultados dos dois ensaios (conjunto de dados, 25 animais/grupo) que se apresentam na Fig. 12 demonstram o aumento da actividade protectora in vivo, contra GBS, dos homoconjugados diméricos do anticorpo monoclonal humano D3, em comparação com a do monómero inicial IgG. Uma quantidade tão pequena como a 4  $\mu$ g de homoconjugado dimérico protegeu os animais de um modo quase tão eficaz como 80  $\mu$ g do monómero.

Apesar de se ter feito a descrição da presente invenção com algum pormenor, a título ilustrativo e com a finalidade de a tornar mais clara, será evidente para o especialista que a mesma poderá ser alvo de alterações e modificações contidas no âmbito das reivindicações em anexo.

1

R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se misturarem anticorpos monoclonais homoconjugados de ligação cruzada por covalência, tendo pelo menos duas moléculas de anticorpos IgG que se ligam ao mesmo determinante antigénico, com um veículo aceitável sob o ponto de vista farmacêutico.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os anticorpos monoclonais homoconjugados



terem duas moléculas de anticorpo.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os anticorpos monoclonais homoconjugados terem três moléculas de anticorpo.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os anticorpos apresentarem ligação cruzada por pontes de dissulfureto.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de os anticorpos serem anticorpos humanos.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as moléculas de anticorpos serem murinas.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as moléculas de anticorpos serem moléculas murinas-humanos quiméricas.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de incluir anticorpo humano de cadeia pesada IgG<sub>1</sub>.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as composições farmacêuticas conferirem protecção contra infecções provocadas por E. coli Kl.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de as composições farmacêuticas conferirem protecção contra infecções provocadas por estreptococos B.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de incluir anticorpos monoclonais homoconjugados que se ligam a um antigénio associado com um tumor, e que inibe o desenvolvimento de células de tumor da mama.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de incluir anticorpos monoclonais homoconjugados capazes de atravessarem a barreira placentária.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de incluir moléculas de anticorpos cujas regiões constantes das cadeias leve e pesada são humanos.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de incluir anticorpos de ligação cruzada derivados da mesma linha de células.

15.- Método de tratamento de um doente portador de doença relacionada com um antigénio, caracterizado pelo facto de se administrar, a esse doente, uma quantidade eficaz, compreendida entre 0,1 mg e 50 mg por quilograma de peso do corpo e por dose, de anticorpos monoclonais homoconjugados, como componente activo e de os anticorpos, citados anteriormente, incluírem pelo menos duas moléculas de anticorpo IgG com ligação cruzada por covalência e que se ligam ao mesmo determinante antigénico.

16.- Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de a doença relacionada com o antigénio ser uma infecção provocada por estreptococos B.

17.- Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de a doença relacionada com o antigénio ser uma infecção provocada por E. coli K1.

18.- Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de se administrarem os anticorpos monoclonais homoconjugados a uma doente grávida e de estes serem capazes de atravessar a barreira placentária e penetrarem na circulação fetal.

...

19.- Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de os anticorpos monoclonais homoconjugados serem capazes de tratar o feto da doença relacionada com o antigénio.

20.- Método de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo facto de a doença relacionada com o antigénio ser uma infecção provocada por estreptococos B ou por E. coli Kl.

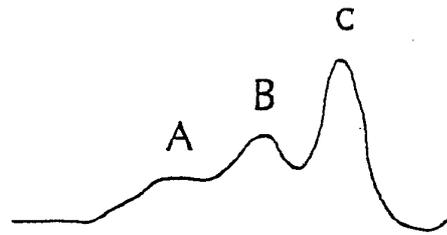
21.- Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de a doença relacionada com o antigénio ser um tumor da mama e de o anticorpo monoclonal homoconjugado se ligar a um antigénio associado com o tumor mamário.

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

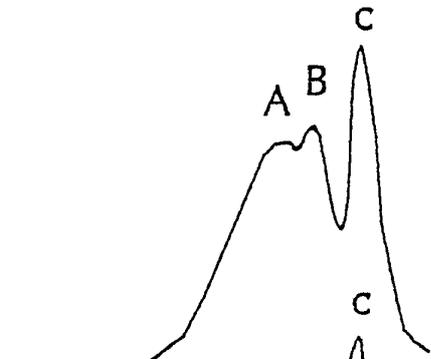
  
\_\_\_\_\_

Handwritten mark resembling a stylized 'L' or '7'.

D3 (Anti-GBS)



5E1-G  
(Anti-E. coli K1)



BR64  
(CARCINOMA DA MASSA)

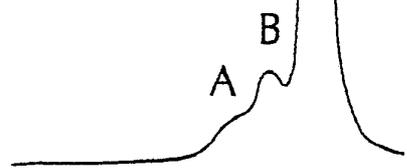


Figura 1

4.

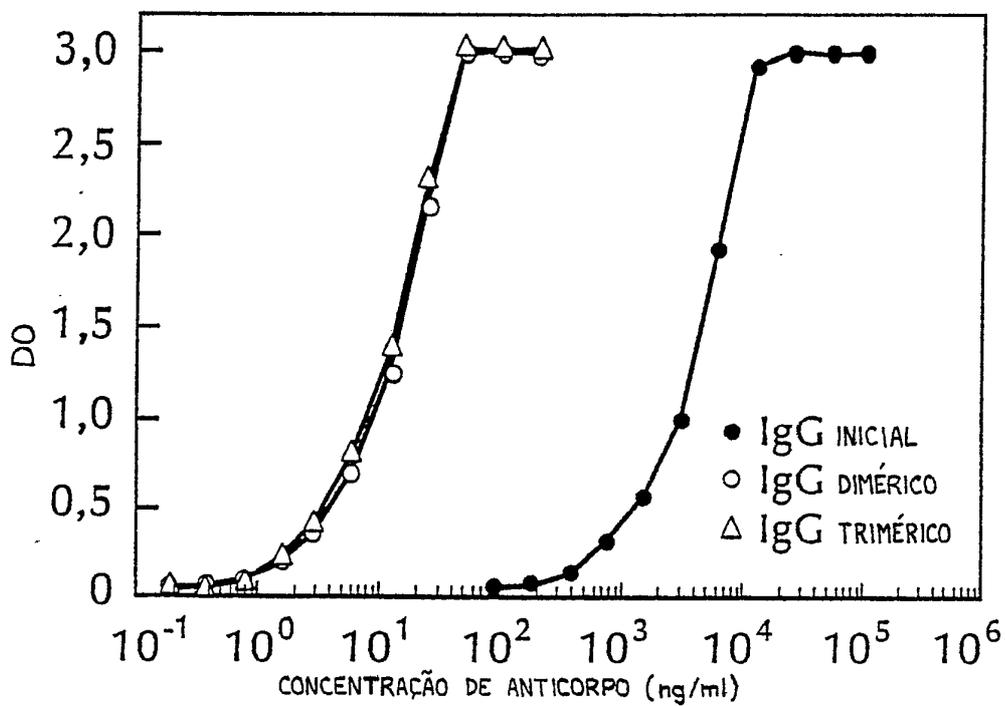


Figura 2

4

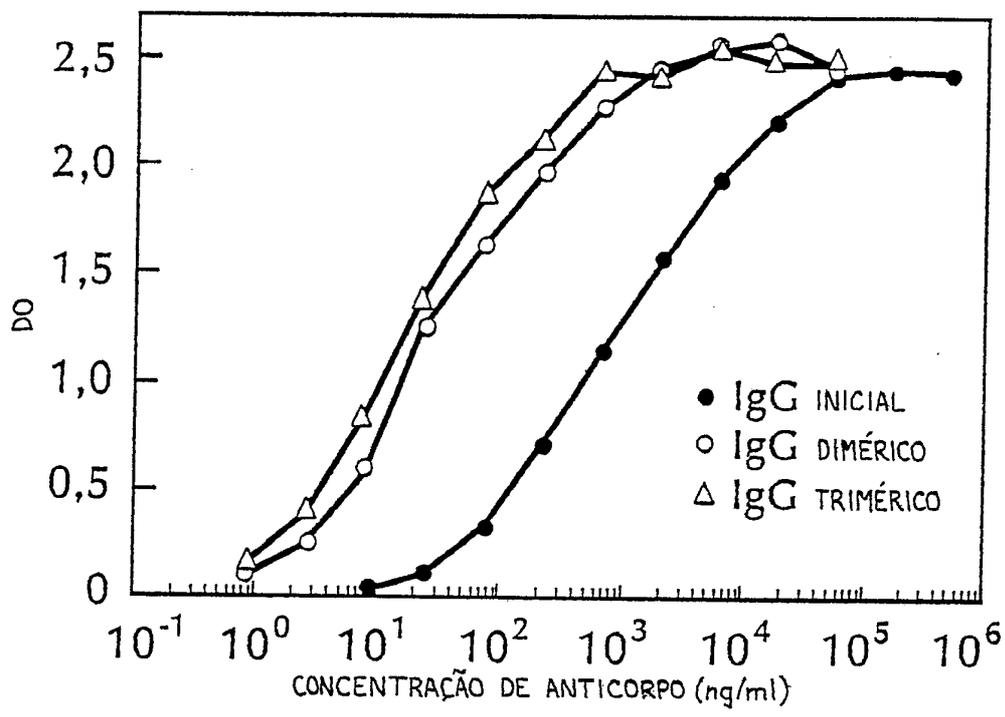


Figura 3

4.

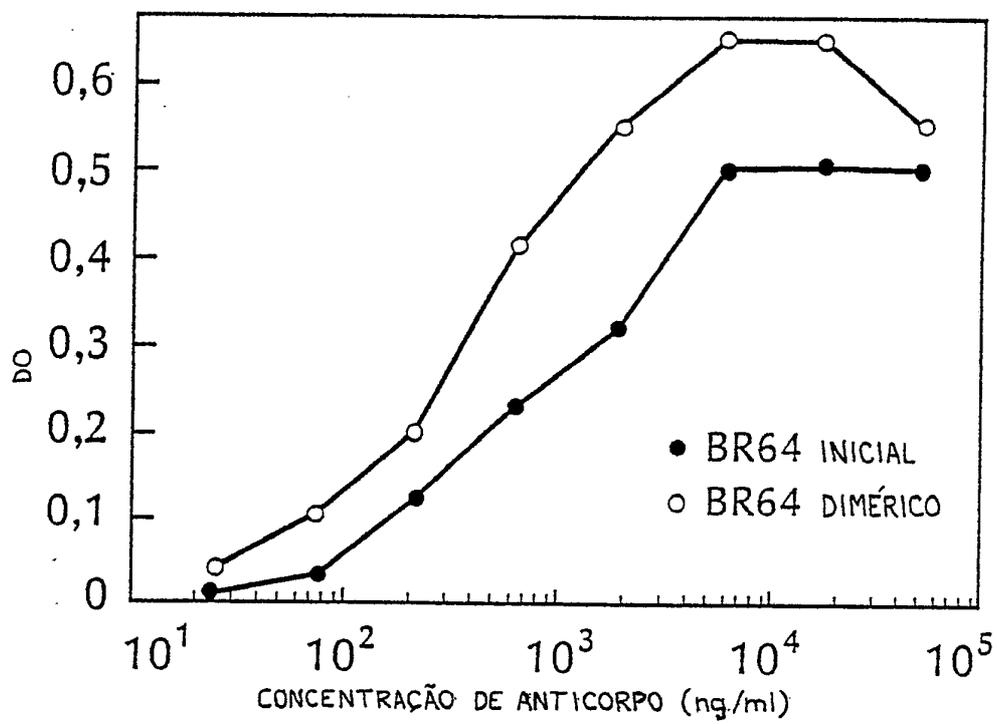


Figura 4

Handwritten mark

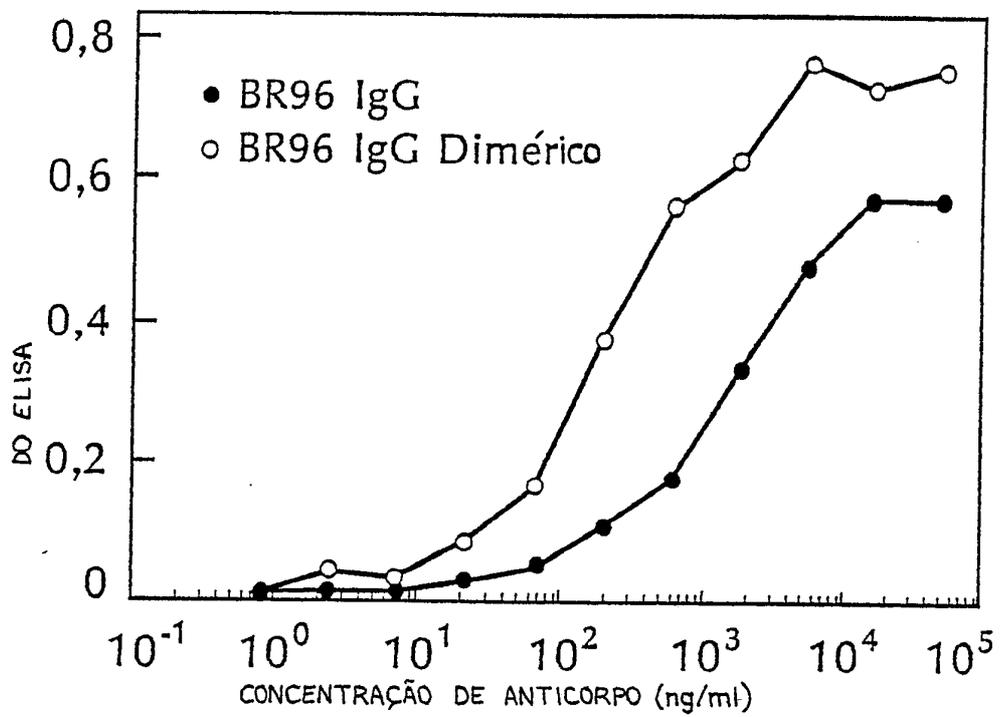


Figura 5A

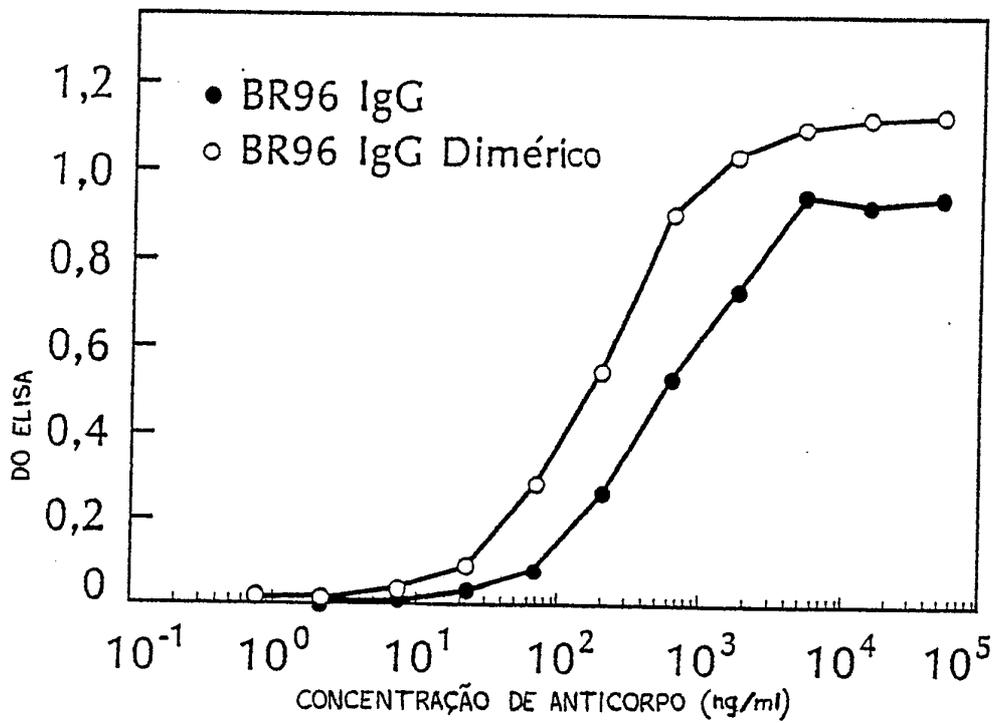


Figura 5B

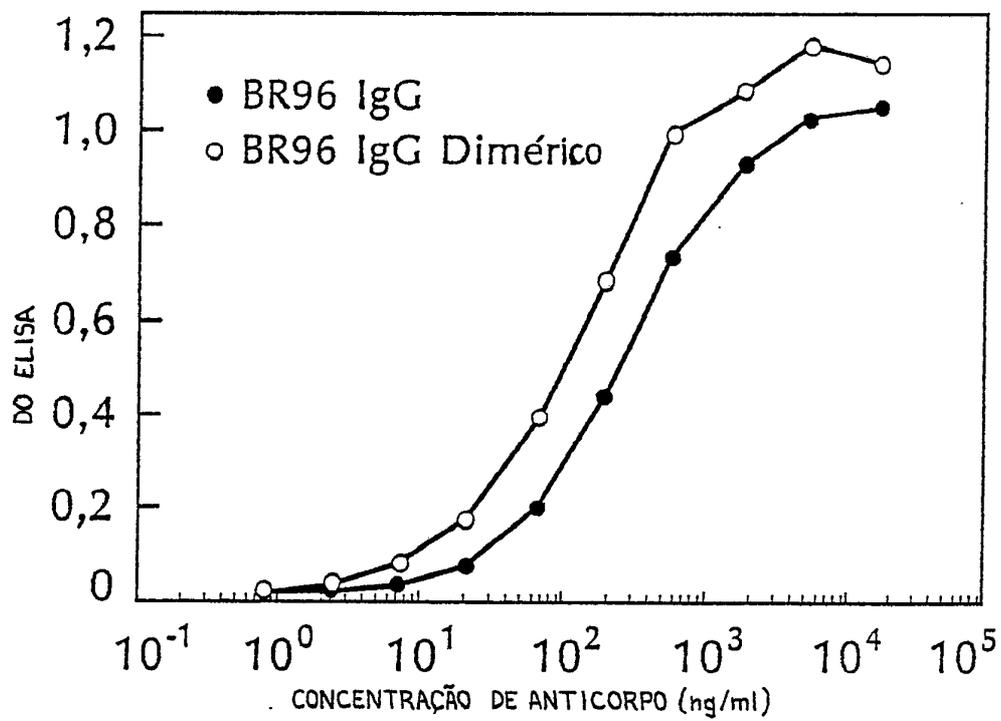


Figura 5C

4.

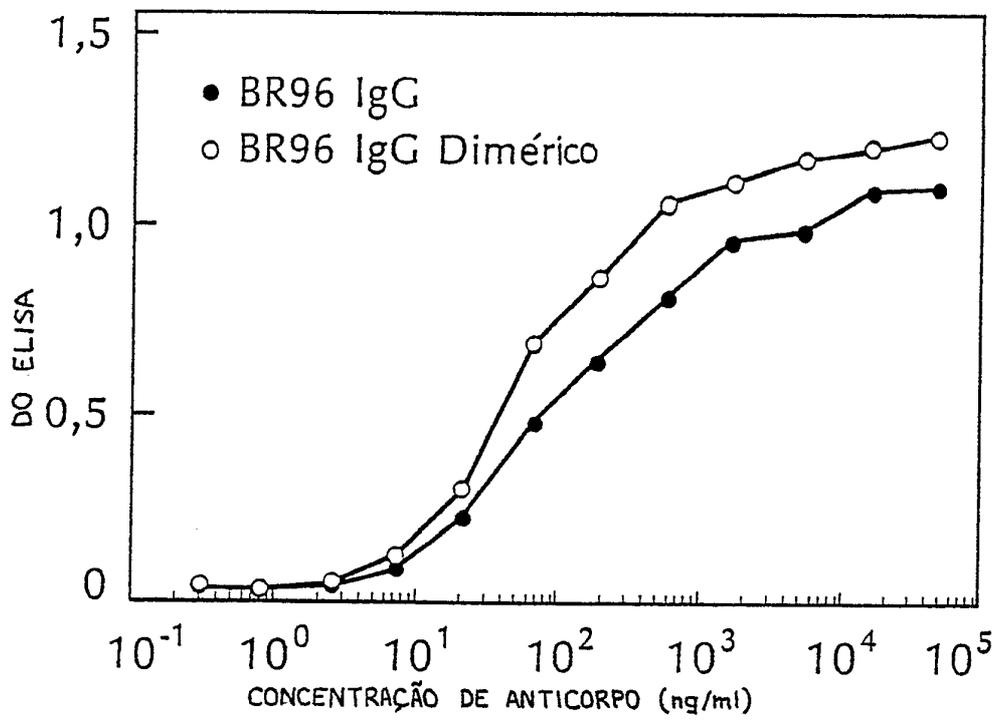


Figura 5D

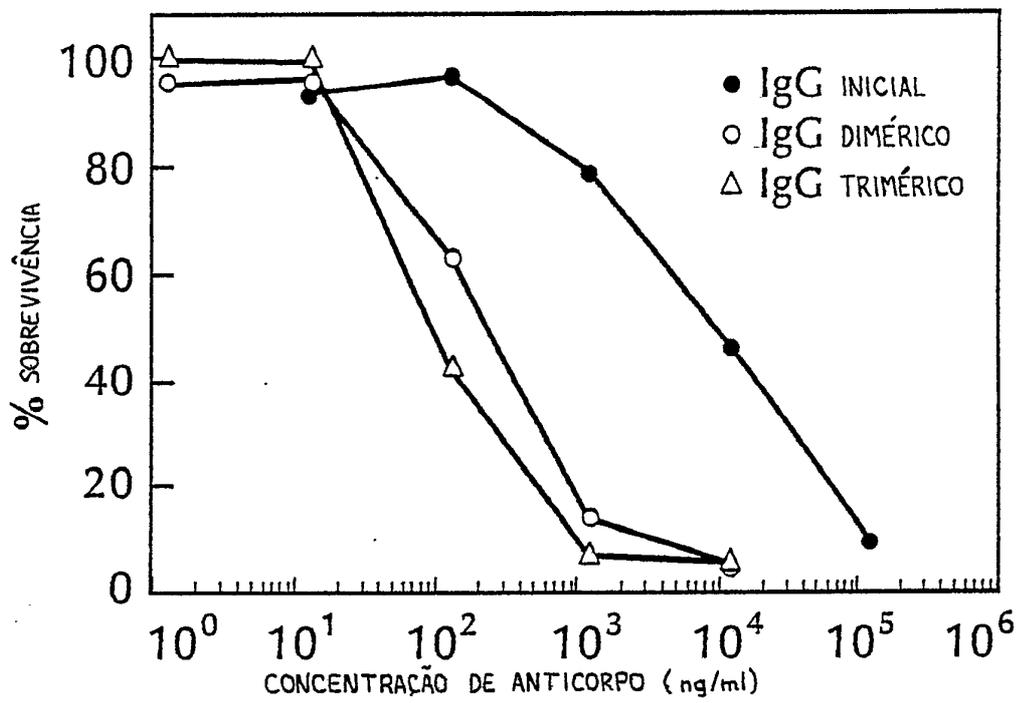


Figura 6

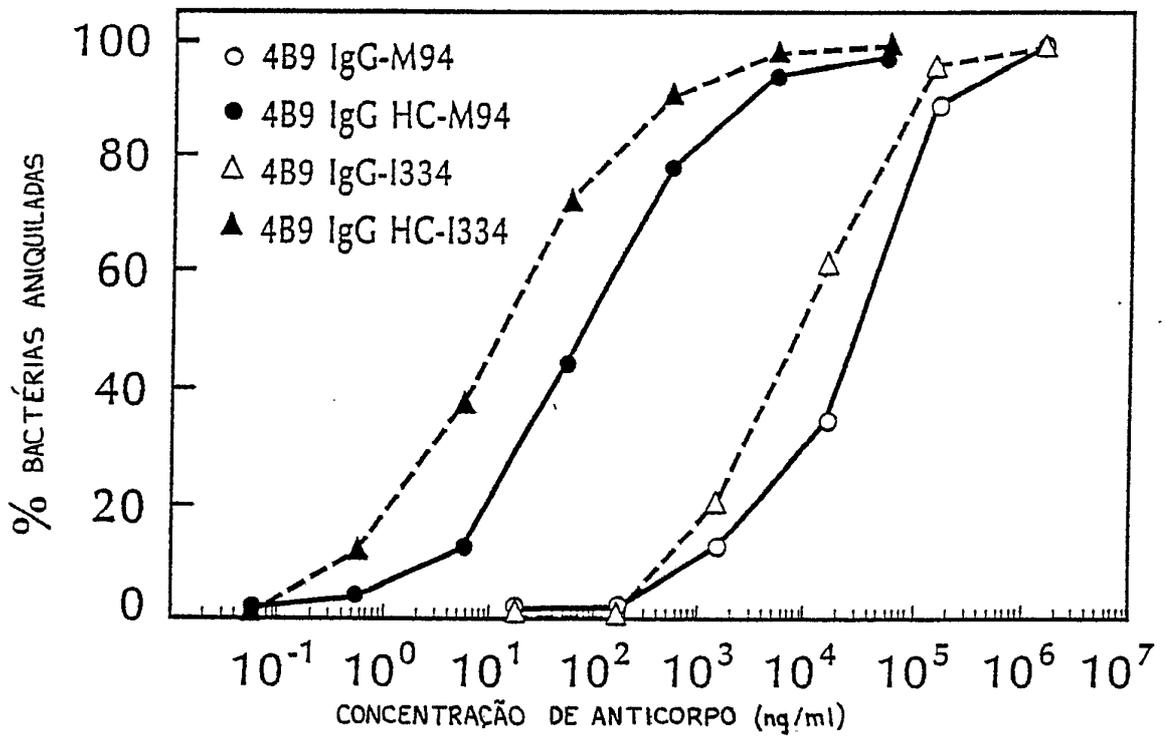


Figura 7

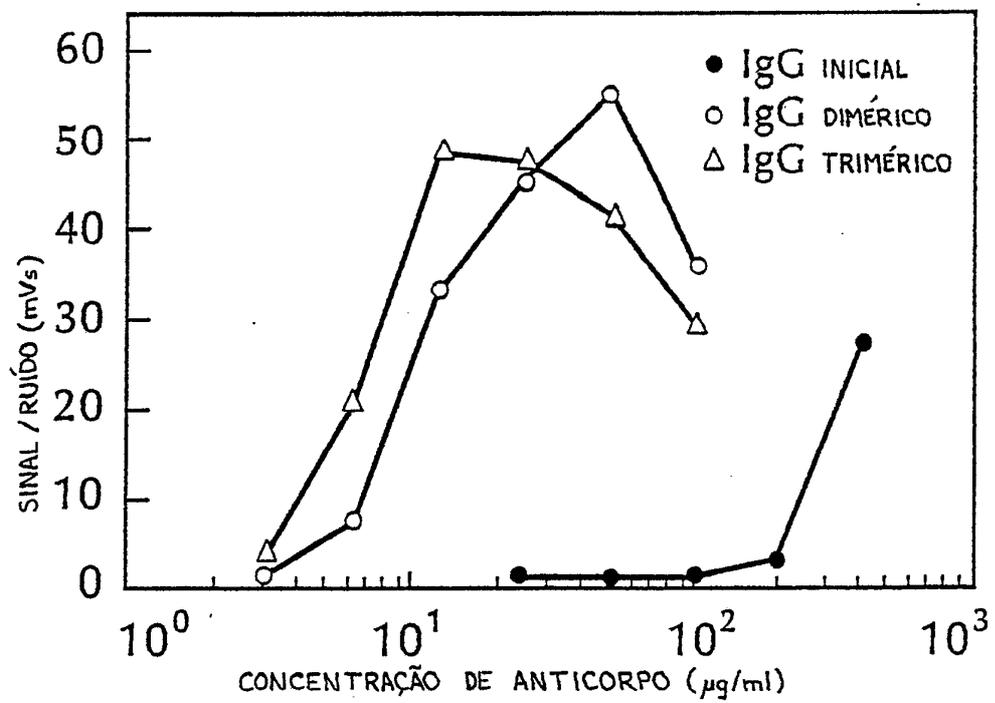


Figura 8

4.

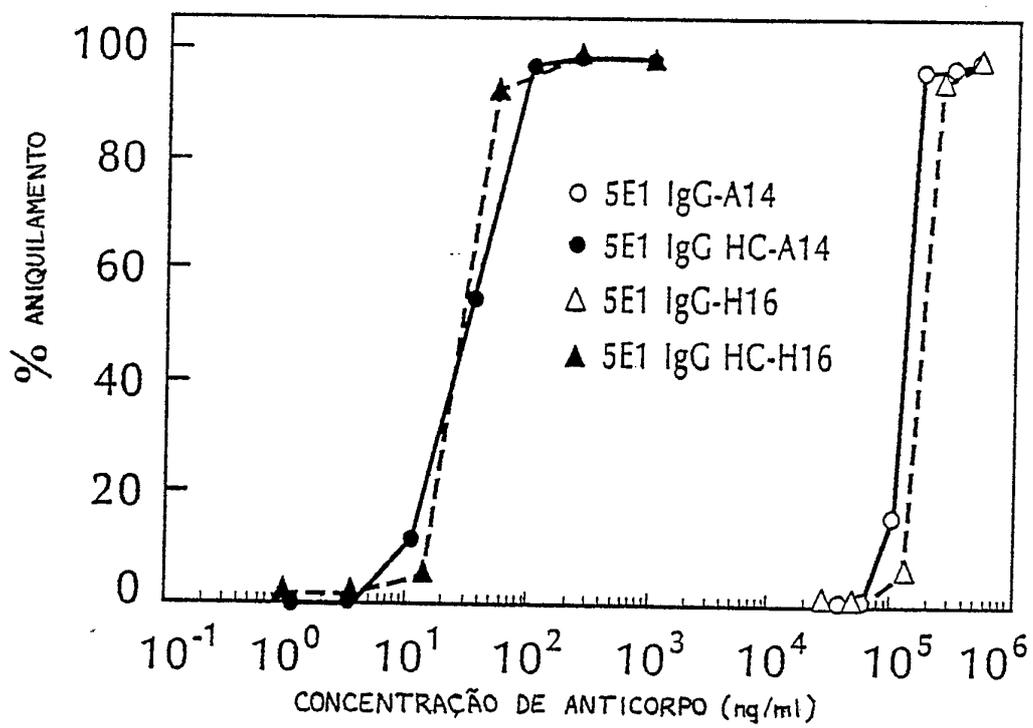


Figura 9

4.

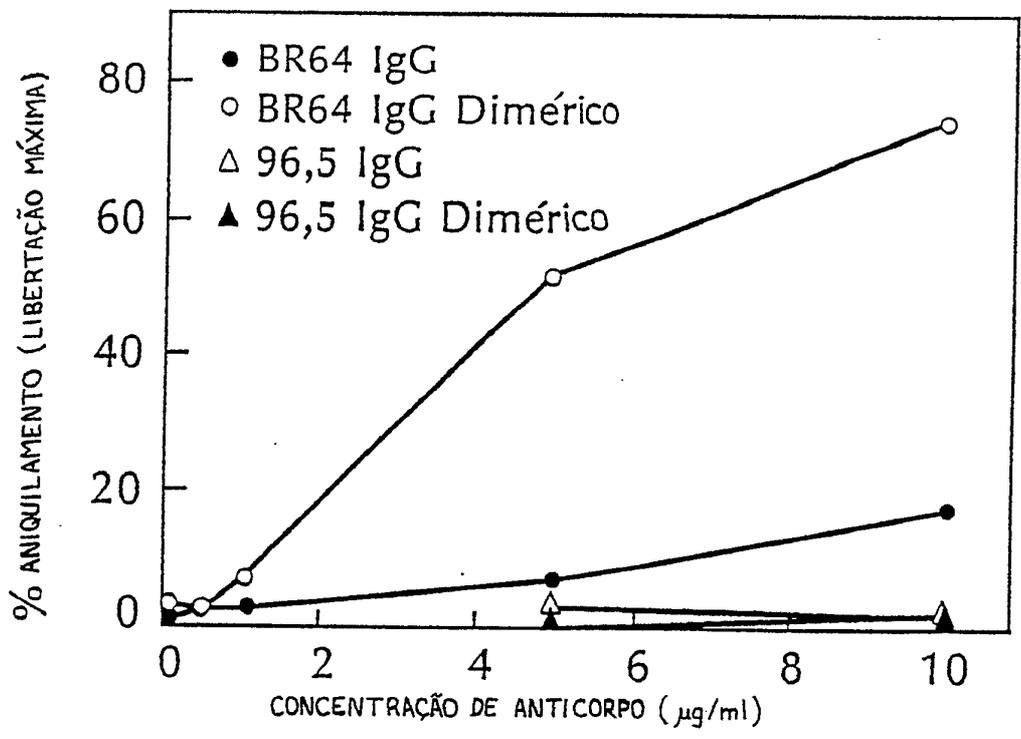


Figura 10

4.

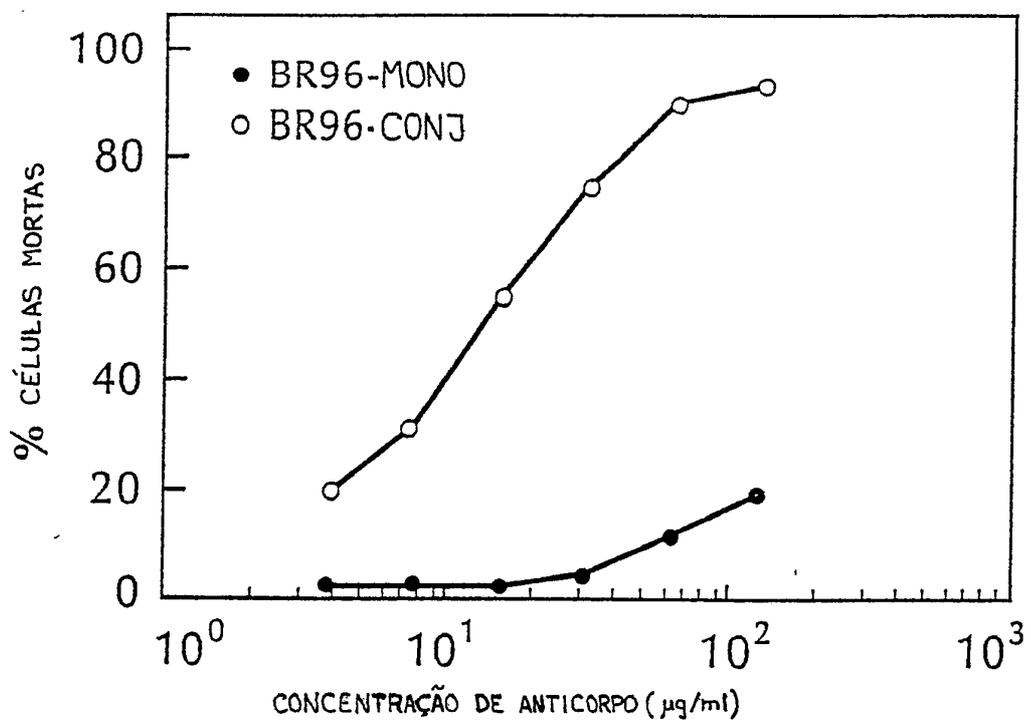


Figura 11

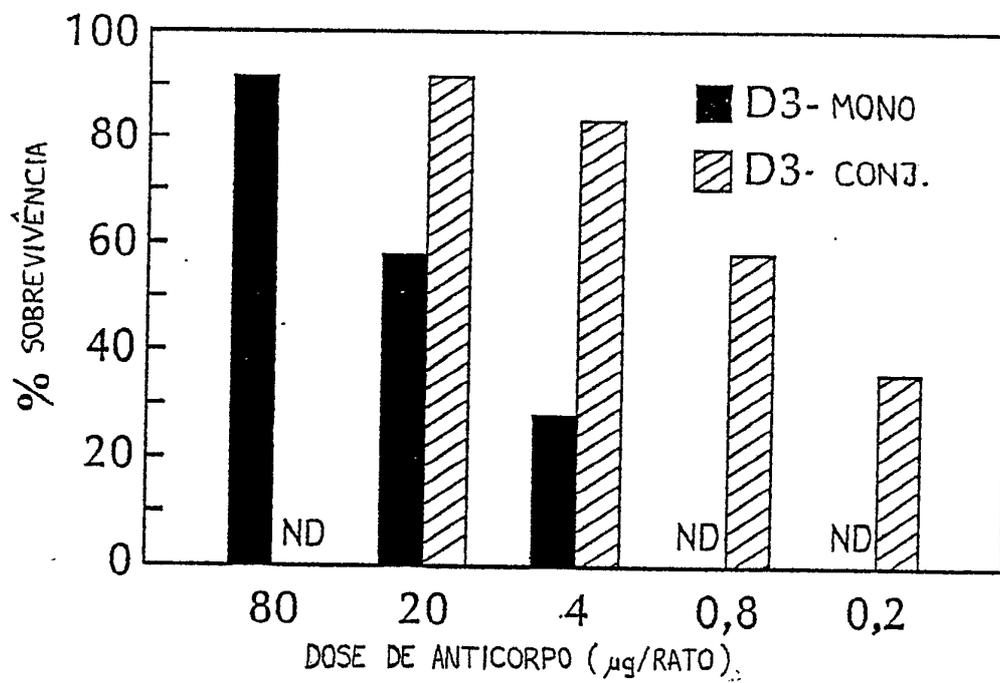


Figura 12