

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 97 916

REQUERENTE: BOEHRINGER MANNHEIM GmbH, alemã, com sede
em Sandhofer Strasse 112-132, D-6800
Mannheim Waldhof, Alemanha

EPÍGRAFE: "Processo de produção de ADN recombinante,
de vectores de expressão e de anticorpos
quiméricos"

INVENTORES: Ulrich H. Weidle, Brigitte Kaluza e Walter
Knapp

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

República Federal da Alemanha em 8 de Junho de 1990
sob o nº P 40 18 442.0



PATENTE Nº 97 916

"Processo de produção de ADN recombinante,
de vectores de expressão e de anticorpos
quiméricos"

para que

BOEHRINGER MANNHEIN GmbH, pretende obter
privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de produção de um ADN recombinante que codifica a cadeia leve ou pesada de um anticorpo em que as regiões constantes são de origem humana e as regiões variáveis são de origem não humana, e que apresenta na direcção da transcrição,

(a) uma sequência de ADNc que codifica a região variável não humana, inclusivé a região J e, eventualmente, a D,

(b) uma sequência de intrão que apresenta, no seu terminal 5", um local doador da união (splice-donor), e a qual se compõe de uma sequência parcial de intrão não humana, no seu terminal 5", e de uma sequência parcial de intrão humana, no seu terminal 3", e

(c) uma sequência de ADN genómica que codifica a região constante humana, caracterizado por se isolar polia⁺-ARNm, a partir de uma linha de células de hibridoma, que segrega um anticorpo de especificidade desejada, se produzir uma biblioteca de ADNc, correspondente, em vectores apropriados, examinando-a, por hibridação com oligonucleótidos complementares ao ADN que codifica a parte constante do anticorpo, para identificar clones que contenham o ADNc para cadeias de anticorpos, por se isolar a partir daí as sequências V, J e, eventualmente, a D, introduzindo a seguir, através de mutagénese dirigida, no respectivo domínio J, na direcção da transcrição, um local doador da união ("splice-do-



hor"), uma parte de uma sequência de intrão de anticorpo de origem não humana, e um sítio de restrição, e se separarem pela digestão com a respectiva enzima de restrição, as sequências que codificam a região constante, e se ligar o ADN obtido a uma sequência de ADN genómica, que codifica a região constante da cadeia leve ou pesada de um anticorpo humano e que apresenta, no seu terminal 5', uma parte de uma sequência de intrão humano correspondente.

O invento refere-se ainda ao processo de produção de vectores de expressão e de anticorpos quiméricos.

MEMÓRIA DESCRITIVA

O presente invento refere-se a um ADN recombinante que codifica a cadeia leve ou pesada de um anticorpo em que as regiões constantes são de origem humana e as regiões variáveis são de origem não humana, a vectores de expressão contendo um ADN recombinante deste tipo, assim como a processos para a produção do ADN recombinante ou dos vectores de expressão, respectivamente, e por fim, a processos para a produção do anticorpo quimérico.

A utilização de anticorpos para fins terapêuticos é de uma importância cada vez maior. Assim, por exemplo, anticorpos contra o receptor da interleucina 2 (IL-2) têm um grande interesse terapêutico como agentes supressores da imunidade. A eficácia *in vivo* de anticorpos deste género pode ser comprovada numa série de modelos experimentais em animais. Exemplos disso são descritos, em relação a transplantações do coração e da pele, no rato, por Kirkman et al., Transplantation Proceedings 19 (1987) 618-690 e T. Diamantstein et al., Transplantation Reviews 1 (1987), 177 - 196, em relação à transplantação do coração, na ratazana, por J.W. Kupiec-Weglinski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 2624, em relação à transplantação de ilhas de Langerhans, na ratazana, por Hahn et al., Diabetologia 30 (1987), 40, e em relação à transplantação dos rins, em primatas, por T. Diamantstein et al., Transplantation Reviews 1 (1987) 177-196. Também em relação ao Homem foi descrita a aplicação preventiva com êxito de anticorpos de ratazana contra o receptor da IL-2, em transplantações dos rins (J.P. Soulillou et al., J of Autoimmunity 1 (1988) 655-661; D. Cantarovitch et al., Am. J. of Kidney Disease 11 (1988) 101-106.

No entanto, existe um inconveniente já que os anticorpos de rato e de ratazana podem, após a aplicação no Homem, ser fortemente imunogénicos, o que pode ter como consequência uma neutralização da actividade terapêutica. Por isso, existe um grande interesse na disponibilidade de anticorpos híbridos de rato/Homem ou de anticorpos humanizados, dos quais se espera um efeito imunogénico, no Homem, essencialmente reduzido ou até eliminado



(S.L. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; P.T. Jones et al., Nature 321 (1986) 522-525).

Os anticorpos híbridos deste género têm sido produzidos até à data, na maior parte das vezes, pela fusão de acordo com a engenharia genética de ADNc apropriados e pela expressão em células hospedeiras apropriadas. No entanto existe, nestes casos, o problema de que os ADNc codificadores de os anticorpos híbridos serem mal expressos. Numa outra forma de produção para a construção de tais anticorpos, usualmente isolam-se e caracterizam-se, em primeiro lugar os genes para a cadeia leve e para a pesada, de uma biblioteca de fagos. A seguir realiza-se a fusão de acordo com a engenharia genética do ADN genómico da região VJ ou da região VDJ, respectivamente, com o ADN genómico correspondente das regiões constantes das cadeias leves e pesadas humanas (ver a este respeito S.L. Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; S.H. Boulianne et al., Nature 312 (1984) 641-646; L.K. Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 214-218; Y. Nishimura et al., Cancer Res. 47 (1987) 999-1005; B.A. Brown et al., Cancer Res 47 (1987) 3577-3583).

Dado que é preciso examinar, regra geral, 10^6 placas, para encontrar um gene com o número de cópias 1, esta segunda forma de proceder exige muito tempo de trabalho. Além disso, a caracterização dos isolados genómicos (mapeamento de restrição, caracterização da estrutura dos genes em células somáticas e em células que participam na transmissão hereditária, caracterização dos genes rearranjados correcta e erradamente) leva muito tempo.

O problema do presente invento era, por isso, facilitar a produção de anticorpos quiméricos.

Este problema é resolvido de acordo com o invento por um ADN recombinante que codifica a cadeia leve ou pesada de um anticorpo em que as regiões constantes são de origem humana e as regiões variáveis de origem não humana, ADN esse caracterizado por apresentar, na direcção da transcrição,

(a) uma sequência de ADNc que codifica a região variável não hu-

mana, inclusivé a região J e, eventualmente, a D,

- (b) uma sequência de intrão que apresenta, no seu terminal 5', um local doador da união ("splice-donor"), e a qual se compõe de uma sequência parcial de intrão não humana, no seu terminal 5', e de uma sequência parcial de intrão humana, no seu terminal 3', e
- (c) uma sequência de ADN genómica que codifica a região constante humana.

Por meio do ADN recombinante é possível produzir, com um rendimento surpreendentemente elevado, as cadeias leves ou pesadas de anticorpos quiméricos com a especificidade desejada. Neste caso é, além disso, uma vantagem muito particular ser possível ligar, através da sequência de intrão, a sequência de ADNc para a região variável com a especificidade desejada, sequência essa que se obtém facilmente, (é fácil produzir ADNc para genes de anticorpo, visto que a proporção do respectivo ARNm existente no ARNm total, em células de hibridoma, é elevada) a um segmento de ADN genómico já subclonado que codifica as regiões constantes humanas e que tem, desta maneira, uma ampla aplicabilidade. O presente invento cria, portanto, uma possibilidade de produzir, com poucos recursos técnicos, moléculas de ADN recombinante que apresentam sempre a sequência de ADN com a especificidade respectiva.

A sequência de ADNc a) do ADN recombinante de acordo com o invento compreende, para uma cadeia leve, as regiões V e J, e para uma cadeia pesada, adicionalmente, a região D entre V e J. O ADN recombinante de acordo com o invento contém, com os seus elementos a), b) e c), em todos os locais onde os genes de anticorpos naturais têm intrões, sequências de ADN correspondentes, com excepção dos locais onde existem intrões na sequência de sinal em todas as cadeias leves e pesadas. A expressão do ADN recombinante de acordo com o invento em células hospedeiras apropriadas tem um rendimento muito mais elevado nos anticorpos desejados em comparação com os processos conhecidos até à data para a produção de anticorpos quiméricos utilizando a expressão de ADNc.

Numa caracterização preferida do invento, a sequência a) assim como a sequência parcial de intrão não humana de b) são de



origem murina, tendo a sequência parcial de intrão não humana de b), de preferência, um comprimento de 15 a 20 nucleótidos.

Prefere-se sobretudo uma concretização em que a sequência parcial de intrão não humana de b) faz parte da sequência de intrão que segue naturalmente, isto é no ADN genómico, a sequência a). Dentro dos limites do presente invento, no entanto, é também possível utilizar outras sequências de intrão não humanas, de preferência, porém, da mesma espécie e, se for possível, também derivadas de um gene de anticorpo.

Numa outra concretização do invento, o local de doador da união em b) apresenta a sequência GT.

De acordo com o invento existe, de preferência, um local de ramificação ("branch-site") na parte humana da sequência de intrão, a qual pode corresponder, por exemplo, a uma das sequências conhecidas, tal como foram descritas por Sharp, P.A., Science 235 (1987) 766-771. No entanto, o local de ramificação pode encontrar-se também na parte murina do intrão.

Para regular a taxa de expressão possível do ADN recombinante, junta-se ainda, de preferência na extremidade 5" do ADN recombinante, uma sequência de promotor que serve de controlo da expressão das sequências que codificam as cadeias de anticorpo. Neste caso é possível utilizar, por exemplo, os promotores que controlam de modo natural, quer dizer como no genoma, as respectivas sequências do ADN recombinante. No entanto utilizam-se, de preferência, promotores que facilitam uma expressão reforçada, eventualmente regulável. Os peritos conhecem promotores deste género. Prefere-se sobretudo uma forma de concretização em que o ADN recombinante apresenta o promotor do citomegalavirus.

Uma outra concretização preferida do invento é um ADN recombinante cuja sequência a) codifica a região variável da cadeia leve ou pesada de um anticorpo capaz de se ligar de modo específico ao receptor da interleucina 2. Além disso, prefere-se que uma sequência c) humana do ADN recombinante de acordo com o

invento, a qual codifica uma cadeia pesada, codifique a região constante da cadeia pesada de um anticorpo humano do tipo IgG.

Os ADN recombinantes deste tipo encontram-se nos plasmídeos pK chim. e p γ chim., apresentando o plasmídeo pK chim. uma sequência de ADN recombinante que codifica a cadeia leve, isto é, a cadeia capa, e o plasmídeo p γ chim. um ADN recombinante que codifica uma cadeia pesada do tipo γ , codificando ambos, em conjunto, um anticorpo com uma especificidade que se dirige contra a cadeia alfa do receptor da interleucina 2 e que é do tipo IgG.

Um outro objecto do presente invento é um vector de expressão contendo um dos ADN recombinantes de acordo com o invento assim como todos os elementos necessários para a expressão deste ADN recombinante. Estes elementos necessários ou utilizados de preferência são promotores, sequências de regulação e semelhantes. Os peritos conhecem bem vectores de expressão, que são descritos mais detalhadamente, por exemplo, por E.L. Winnacker em "Gene und Klon", 1985, Verlag Chemie, Weinheim. O vector de expressão de acordo com o invento torna possível introduzir um ADN recombinante de acordo com o invento em células hospedeiras apropriadas e exprimi-lo aí. Vectores de expressão particularmente preferidos contendo ADN recombinante de acordo com o invento, os quais são também objecto do presente invento, são os plasmídeos pK chim. e p γ chim. já mencionados.

Um outro objecto do invento é um processo para a produção de um ADN recombinante de acordo com o invento, processo esse em que se isola, a partir de uma linha celular de híbridoma que segrega um anticorpo com a especificidade desejada, poliA⁺ ARN, construindo-se uma biblioteca de ADNc correspondente em vectores apropriados e procurando nesta, através de hibridação com oligonucleótidos complementares a um ADN que codifica a parte constante do anticorpo, clones contendo o ADNc para cadeias de anticorpo, isolando a seguir as suas sequências V, J e, eventualmente, D, introduzindo a seguir, através de mutagénese dirigida, aos respectivos domínios J, no sentido da transcrição, um local doador da união, uma parte de uma sequência de intrão de

anticorpo de origem não humana e um local de restrição, e separando as sequências que codificam a região constante através de digestão por meio da respectiva enzima de restrição, ligando o ADN obtido a uma sequência de ADN genômica que codifica a região constante da cadeia leve ou pesada de um anticorpo humano e que apresenta, na sua extremidade 5', uma parte de uma sequência de intrão humana correspondente.

O isolamento do poliA⁺ ARN, a respectiva síntese do ADNc, assim com a elaboração de uma biblioteca de ADNc são realizados de acordo com métodos em princípio conhecidos como são descritos, por exemplo, em Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor. A escolha dos clones de ADNc codificadores de cadeias de anticorpo também é realizada de maneira habitual, isto é, procurando clones que formem híbridos com um oligonucleótido complementar a um ADN que codifica a região constante de um anticorpo originário da mesma espécie de células de hibridoma.

Também a mutagénese dirigida, para a introdução do local doador de união e do local de restrição é em princípio conhecida e é realizada de acordo com o método descrito por Morinaga et al., Bio/Technology 2 (1984) 636-639.

Numa concretização preferida do presente invento utiliza-se uma célula de hibridoma de rato ou de ratazana. A produção de células de hibridoma que segregam anticorpos com a especificidade desejada é realizada de acordo com o método que foi descrito, pela primeira vez, por Köhler e Milstein (Nature 256 (1975), 495) e mais tarde aperfeiçoado. Os peritos activos neste domínio da investigação conhecem bem estes trabalhos. No processo de acordo com o presente invento prefere-se utilizar sobretudo uma célula de hibridoma de rato, a qual segrega anticorpos dirigidos contra a cadeia alfa do receptor da interleucina 2 humana.

Na introdução da sequência parcial de intrão não humana utiliza-se, de preferência, uma sequência de 15 a 20 pares de bases de comprimento. Neste caso, prefere-se sobretudo, parcialmente, a

sequência de intrão subsequente do gene autêntico. Além disso, prefere-se introduzir, como local doador de união a sequência nucleotídica GT.

Por fim, prefere-se, de acordo com o invento, utilizar um ADN genómico humano cuja sequência parcial de intrão contém um local de ramificação.

Para se obter um ADN recombinante que pode ser facilmente expresso, coloca-se, de preferência, a montante da sequência de ADN que acaba de ser obtida, uma sequência de promotor ou realizam-se logo as manipulações necessárias de acordo com o invento, num vector que contém um promotor em posição apropriada. Neste caso prefere-se sobretudo utilizar o promotor do genoma do citomegalovirus.

Numa outra caracterização preferida do presente invento utiliza-se, para a produção de um ADN recombinante que codifica uma cadeia pesada, uma sequência de ADN genómica humana que codifica a região constante da cadeia pesada de um anticorpo do tipo IgG.

Um outro objecto do presente invento é um processo para a produção de um vector de expressão de acordo com o invento, processo esse em que se insere num vector apropriado para a expressão de um gene estranho um ADN recombinante de acordo com o invento. Como já foi dito acima, os peritos conhecem vectores desse tipo, que contêm todos os elementos necessários como, por exemplo, polilígar, para a inserção do ADN recombinante, genes de resistência a antibióticos, para se poderem localizar colónias contendo o ADN recombinante, uma origem de replicação, elementos de regulação, um promotor, no caso do ADN recombinante ainda não o apresentar, assim como, eventualmente, outros elementos como, por exemplo, genes supressores.

Um outro objecto do invento é um processo para a produção de um anticorpo quimérico cujas regiões variáveis são de origem não humana e cujas regiões constantes são de origem humana, processo esse em que se introduz em células hospedeiras apropriadas um



vector de expressão que contém um ADN recombinante de acordo com o invento que codifica a cadeia leve e um vector de expressão que contém um ADN recombinante de acordo com o invento que codifica a cadeia pesada do anticorpo, em que se isolam transformantes estáveis e em que se obtêm os anticorpos, através de métodos em princípio conhecidos, a partir da solução sobrenadantes das culturas das células. Como célula hospedeira utiliza-se, de preferência, uma célula de hibridoma não produtora, e prefere-se sobretudo a linha celular Sp/2/O. Para a introdução dos vectores prefere-se, no processo de acordo com o invento, realizar uma electroporação (Nucl. Acids Res. 15 (1987), 1311-1326, Bio Techniques 6 (1988), 742-751), eventualmente com moléculas de ADN linearizadas. No entanto, é também possível utilizar outros métodos de transfecção das células hospedeiras, que os peritos conhecem.

O processo de acordo com o invento torna possível produzir, de maneira simples, anticorpos com especificidades muito diferentes, os quais, na sua aplicação terapêutica no homem, não são imunogénicos ou o são apenas muito francamente, dado que as regiões constantes são de origem humana. Através da possibilidade, hoje em dia relativamente fácil de produzir, por exemplo, células de hibridoma de rato, as quais segreguem anticorpos com uma especificidade desejada e de isolar a partir delas ADNc, é fácil introduzir, de acordo com o presente invento, este ADNc em vectores já preparados para isso, os quais contêm as partes genómicas humanas para as regiões constantes da cadeia leve ou pesada, respectivamente. Desta maneira é possível obter, através da simples integração do fragmento de ADNc desejado nos vectores devidamente preparados, anticorpos quiméricos com a especificidade respectiva desejada, após a expressão do ADN recombinante dos dois vectores numa célula hospedeira. A produção não é somente muito mais fácil do que através dos processos até à data conhecidos, mas tem também um rendimento muito mais elevado.

Um outro objecto do presente invento são, por isso, os anticorpos quiméricos MAK 179, MAK 215 e MAK 447, cujas sequências, para as cadeias leves e pesadas, se mostram nos protocolos sequenciais SEQ ID NO.:1 a 6 (são indicadas as sequências das re-

giões variáveis; as sequências das regiões constantes são conhecidas e são descritas, por exemplo, em: Sequences of proteins of immunological interest; E. Kabat, T. Wu, M. Reid-Miller, H. Perry e K. Gottesman, US Department of Health and Human Services, 1987, pág. 282-325) e cuja produção se descreve nos exemplos. Todos os três anticorpos têm especificidade em relação à cadeia alfa do receptor humano da IL 2.

O invento é ilustrado a seguir mais pormenorizadamente através dos exemplos seguintes, em combinação com os protocolos sequenciais e as figuras.

SEQ ID NO.:1 mostra a sequência de ADN e aminoácidos da região variável da cadeia leve de MAK 179,

SEQ ID NO.:2 mostra a sequência de ADN e aminoácidos da região variável da cadeia leve de MAK 447,

SEQ ID NO.:3 mostra a sequência de ADN e aminoácidos da região variável da cadeia leve de MAK 215,

SEQ ID NO.:4 a 6 mostra as sequências correspondentes das respectivas regiões variáveis das cadeias pesadas;

A figura 1 representa o esquema do isolamento de um fragmento de ADNc murino que codifica a região variável da cadeia leve de imunoglobulina, e de realização da mutagénese dirigida;

A figura 2a representa a inserção da região murina variável num vector de expressão;

A figura 2b representa o esquema da junção das sequências humanas e murinas codificadoras de anticorpos em relação à cadeia leve;

As figuras 3 e 4a assim como 4b mostram o esquema do mesmo processo em relação ao ADN das cadeias pesadas de imunoglobulina.

Exemplo 1

Clonação e análise sequencial das cadeias leves e pesadas de MAK 179, 447 e 215

A partir das linhas de hibridoma que segregam os anticorpos monoclonais 179, 447 e 215, respectivamente, foi preparado ARN (Cleary et al., Cell 44 (1986) 97-106) e, a partir dele isolado, através de uma coluna de celulose oligo-dT (collaborative Rese-

arch, Bedford, MA), polia⁺ ARN (Maniatis, T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1982). Por meio do equipamento de clonagem de ADNc de Pharmacia foi elaborada, de acordo com as instruções do fabricante (em analogia com Gubler, U. e Hoffman, G.J.: Gene (1983) 25, 263), para cada linha celular de hibridoma, uma biblioteca de ADNc. Compreendia, para cada linha de hibridoma, cerca de 10 000 recombinantes.

Para a selecção de clones da cadeia κ foi utilizado o iniciador seguinte:

5'CCCGACTACGACGT3'

Para a selecção de clones da cadeia λ (λ 1 e λ 2b) foi utilizado o iniciador seguinte:

5'CAGATAGGTGACCGG3'

Com este iniciador são abrangidas todas as cadeias pesadas de genes de imunoglobulina de rato (Sablitzky, F. e Rajewski, K.: EMBO J. 3(1984) 3005-3012).

A biblioteca de ADNc foi introduzida no vector pT7T318U (Pharmacia). Através disto foi possível recuperar as inserções como fragmento de EcoRI. A análise com endonucleases de restrição deu como resultado a obtenção, para as cadeias leves e pesadas de MAK 179, 447 e 215, de clones com o comprimento total. As regiões relevantes foram subclonadas em vectores M13 e sequenciadas (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467).

As sequências das regiões variáveis são representadas nos protocolos sequenciais SEQ ID NO:1 a NO:6. Verifica-se que o Mak179 e o 447 utilizam os mesmos segmentos V para as cadeias leves e pesadas.

Ambas as cadeias κ utilizam a região J1 e possuem, nos locais de transição VJ, nucleótidos idênticos, o que aponta para uma origem comum da região VJ dos dois genes κ . Ambas as cadeias λ 1 possuem a mesma região D, a mesma região J (J_{H3}) e uma recombinação VDJ idêntica, do que se pode concluir que as regiões



V_DJ dos dois genes γ 1 têm uma origem comum.

Da comparação das sequências de aminoácidos das cadeias capa resulta que 3 aminoácidos das regiões V de ADNc capa de MAK179 e MAK447 foram substituídos. Trata-se das substituições seguintes: Thr por Ser, aminoácido 20), (Lys por Arg, aminoácido 45), (Asn por Lys, aminoácido 53).

98 % dos aminoácidos da região VJ de MAK179 e 447 são idênticos.

Existem 6 substituições de aminoácidos nas regiões V do ADNc γ 1 de MAK179 e MAK447. Trata-se das substituições seguintes: (Val por Ala, aminoácido 23; Gly por Ser, aminoácido 56; Ile por Val, aminoácido 58; Thr por Arg, aminoácido 63; Lys por Arg, aminoácido 65; Gln por Glu, aminoácido 82).

94 % dos aminoácidos das regiões VJ de MAK179 e 447 são idênticos.

Os dados sugerem que as diferenças nas sequências de aminoácidos de MAK179 e 447 se devem a uma mutação somática.

Nos protocolos sequenciais referentes ao ADNc capa e γ 1 de MAK179 e 447 indica-se o codão de iniciação (Met) = início da sequência de sinalização. São indicadas também as regiões J e D_J, respectivamente, assim como o início das respectivas regiões constantes.

As sequências das regiões variáveis para a cadeia capa e γ 2b do anticorpo MAK215 não inibidor (em relação à ligação IL 2) são representadas nas SEQ ID NO:3 e NO:6.

Para a cadeia capa utiliza-se a região J4. É utilizado um segmento V que difere muito do das cadeias leves de MAK179 e 447.

Em comparação com o segmento V de 179, 51 % dos aminoácidos são idênticos.

Exemplo 2
Quimerização da cadeia leve de MAK179 e construção de um
vector de expressão para cadeia leve quimerizada.

a) Introdução de sequências doadora de união, de intrão e de No-tI na região VJ1 da cadeia capa de MAK179 (figura 1).

O ADNc para a cadeia leve do MAK 179 murino foi subclonado como fragmento de EcoRI-HpaI em pUC18 (Yanisch-Perron, C. et al., Gene 33 (1985) 103-109), o que deu como resultado o plasmídeo PUCK. Através de mutagênese produz-se um fragmento de EcoRI-NotI (portátil) capaz de ser clonado através das extremidades EcoRI e NotI, o qual contém a região VJ1 de acordo com a organização genômica das cadeias capa de rato. Seguem-no 20 nucleótidos de sequências de intrão, começando pela sequência doadora de união GT, do segmento genômico J1 da cadeia capa de rato (Max, E.E. et al., J. Biol. Chem. 256 (1981) 5116-5220), e uma sequência de reconhecimento (GCGGCCGC) para a endonuclease de restrição NotI. A mutagênese (ver abaixo) é realizada de acordo com Morinaga et al. (Bio/Technology 2 (1984) 636-639).

Eis a sequência do oligonucleótido utilizado para a mutagênese:

Sequência de união
↓
5'GCAAATCAAAC GTAAGTAGAATCCAAAGTCT GCGGCCGC GGGCTGATGCT 3'
J1 J1 Intrão Not I Região constante
de capa de rato

Para a formação de um heterodúplex foram isolados, a partir de PUCK, dois fragmentos.



Fragmento A: O PUCK foi cindido por meio das enzimas de restrição EcoRI e BamHI, os dois fragmentos foram separados através de electroforese em gel (gel de agarose), e o fragmento grande de EcoRI-BamHI foi isolado a partir do gel. Este fragmento não contém sequências capa de rato.

Fragmento B: O pUCK foi tratado com NaeI (local de cisão unico na parte pUC), os resíduos fosfato 5' foram eliminados pelo tratamento com fosfatase alcalina, e a seguir, foi purificado o fragmento duas vezes sobre um gel de agarose 0,7 %.

Para a formação de um heterodúplex, os fragmentos A e B (500 fmol cada) e o oligonucleótido (80 fmol) foram misturados, incubados durante 3 minutos a 100°C em NaCl 50 mmol/l, tris-HCl 10 mmol/l, pH 7,5, MgSO₄ 10 mmol/l e, a seguir, transferidos sobre gelo. A seguir, o ADN foi renaturado (durante 20 minutos a 60°C). Para a síntese de reparação, a mistura reaccional foi ajustada para: desoxinucleósidos trifosfatos (0,25 mmol/l), ATP (1mmol/l), NaCl (100 ml/l), tris-HCl, pH 7,5, (6,5 mmol/l), MgCl₂ (8 mmol/l), β-mercaptoetanol (1 mmol/l), fragmento de Klenow da polimerase de ADN de E.coli (0,125 U/μl de preparação) e ligase T4 (0,1 U/μl de preparação), e incubada durante 4 horas a 16°C. Com a preparação de reacção foi transformada, a seguir, E.coli HB101 e foram seleccionadas colónias em placas de agar contendo ampicilina (50 μg/ml). Por meio da técnica de hibridação de colónias (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982), puderam ser identificadas as colónias em cujo ADN plasmídico tinha sido incorporado o oligonucleótido acima descrito. A caracterização realizou-se, em primeiro lugar, através de análise com endonucleases de restrição. Por fim, a alteração desejada da sequência foi confirmada através de sequenciação (Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467).

b) (construção de um vector de expressão para a cadeia capa quimerizada de MAK 179 (figuras 2a e 2b).

Utilizou-se como plasmídeo de partida pcDNA1 (Invitrogen, San Diego; Aruffo, A. e Seed, B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 84, 8573-8577). Ele contém o promotor do citomegalovirus humano, promotores dos fagos T7 e SP6, um poliligador, sequências doadoras de união e de poliadenilação de SV40, para a selecção, uma ARNT supF, assim como origens de replicação de M13, ColE1, SV40 e polioma. Por razões de clonação, o local de NdeI indicado no desenho foi transformado, pela introdução de um ligador apropriado, num local de PvuI (=pcDNA1-PvuI). Este último plasmídeo foi cindido, no polígador por meio de EcoRI e NotI, e o fragmento de EcoRI-NotI do ADN obtido de acordo com (a) (cerca de 400 pb), contendo a região VJ1 e sequências de intrão de MAK179 capa, foi introduzido no vector. A preparação de ligação foi transfectada na estirpe MC1061/P3 de E.coli (Aruffo, A. e Seed, B.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 8573-8577); Seed, B.: Nucl. Acids Res. 11 (1983) 2427-2445) e foram isoladas colónias resistentes à ampicilina em placas de ágar. O plasmídeo resultante é designado como pcDNAK. Este pcDNAK foi a seguir cindido por meio de PvuI e NotI, e o fragmento mais curto foi isolado sobre um gel de agarose com um ponto de fusão baixo.

O plasmídeo p10195 (produção de acordo com a EP-A 0 378 175) foi igualmente cindido por meio de NotI e PvuI e o fragmento maior (figura 2b) foi isolado sobre um gel de agarose com um ponto de fusão baixo. O p10195 contém sequências de intrão de rato para a cadeia capa, assim como regiões codificadoras e não codificadoras da região constante capa humana.

Os dois fragmentos de pcDNAK e p10195 foram tratados com ligase T4, transfectados em MC1061/P3, e as colónias resistentes à ampicilina foram isoladas. O plasmídeo obtido é designado como pk chim.. O gene híbrido (VJ1-rato-C_{capa}-humano) é expresso sob o controlo do promotor CMV humano (citomegalovirus). Uma cassette de expressão para a fosfotransferase neo (de p10195 introduzido em pk chim.) serve para a selecção de colónias resistentes a G418, após a transfecção em células de mamífero (Southern, P. e Berg, P.: J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982) 327-341).

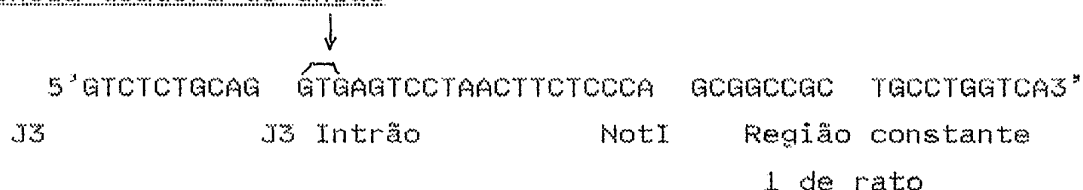
Exemplo 3

Quimerização da cadeia pesada de MAK179 e construção de um vector de expressão para a cadeia pesada quimerizada.

a) Introdução de sequências doadora de união, de intrão e de NotI na região VDJ₃ da cadeia da cadeia $\gamma 1$ de MAK179 (figura 3).

O ADN para a cadeia $\gamma 1$ (região não traduzida 5' e região codificadora até ao local de BamHI na região constante) foi subclonado como fragmento EcoRI-BamHI em pUC18 (Yanisch-Perron, C. et al., Gene 33 (1985) 103-109) = plasmídeo pUC 1.

Através de mutagénese produz-se um fragmento de EcoRI-NotI portátil que contém a região VDJ₃ de acordo com a organização genómica da cadeia $\gamma 1$ de rato, a seguir 20 nucleótidos de sequências de intrão, começando pela sequência doadora de união GT do segmento genómico J₃ da cadeia $\gamma 1$ de rato (Sakano et al., Nature 286 (1980) 676-682), e depois de uma sequência de reconhecimento (GCGGCCGC) para a endonuclease de restrição NotI. A mutagénese foi realizada de acordo com Morinaga et al., (Bio/Technology 2 (1984) 636-639). Eis a sequência do oligonucleótido utilizado para a mutagénese:

Sequência doadora de união

Para a formação de um heterodúplex foram isolados, a partir de pUC $\gamma 1$, dois fragmentos.

Fragmento C: O pUC $\gamma 1$ foi cindido por meio das enzimas de restrição EcoRI e BamHI, os dois fragmentos foram separados através de electroforese em gel (gel de agarose 1 %), e o fragmento grande de EcoRI-BamHI foi isolado a partir do gel. Este fragmento não contém sequências $\gamma 1$ de rato.

Fragmento D: O pUC $\gamma 1$ foi cindido com NaeI (local de cisão único na parte pUC), os resíduos fosfato 5' foram eliminados pelo

tratamento com fosfatase alcalina, e o fragmento foi purificado, a seguir, duas vezes sobre um gel de agarose 0,7 %. Depois de terem sido misturados os fragmentos C e D (500 fmol de cada e o oligonucleótido (80 fmol), foi realizada a mutagênese, como descrita no exemplo 2. Por meio da técnica de hibridação de colônias (Miniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982) puderam ser identificadas as colônias em cujo ADN plasmídico tinha sido incorporado o oligonucleótido acima descrito. A caracterização realizou-se, em primeiro lugar, através de endonucleases de restrição. Por fim, a alteração desejada da sequência foi confirmada através de sequenciação (Sanger, F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977) 5463-5467).

A figura 3 mostra o esquema da produção do fragmento de EcoRI-NotI desejado.

b) a construção de um vector de expressão para a cadeia $\gamma 1$ quimerizada de MAK 179 (figuras 4a e 4b).

O local único NdeI no vector pcDNA1 (Invitrogen, San Diego; Aruffo, A. e Seed, B. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8573-8577) foi transformado, através da introdução de um ligador apropriado, num local PvuI. O plasmideo resultante é designado como pcDNA1-PvuI.

O pcDNA1-PvuI foi cindido por meio de EcoRI e NotI, e introduzido o fragmento EcoRI-NotI de pUC 1-Mut (com sequências VDJ3 e de intrão de $\gamma 1$) descrito na figura 3. O plasmideo resultante é designado como pcDNA $\gamma 1$.

O plasmideo p11201 (produzido de acordo com a EP-A 0 378 175) é cindido por meio de NotI e BamHI, as extremidades protuberantes são completadas com Klenow, é ligado o ligador NotI, cinde-se de novo com NotI, e o fragmento marcado na figura 4b é isolado sobre um gel de agarose com um ponto de fusão baixo. Este fragmento contém sequências de intrão das cadeias pesadas de rato, sequências de intrão das cadeias pesadas humanas, assim como

o equivalente genómico da região constante do gene $\gamma 1$ humano. Este fragmento foi introduzido no local único NotI do vector pcDNA $\gamma 1$. A orientação correcta foi determinada pela cisão com endonucleases de restrição. O vector de expressão resultante para a cadeia 1 quimerizada de MAK179 é designado como p chim. De acordo com o mesmo princípio é possível construir também cadeias quimerizadas de outros isótipos como por exemplo, μ , $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, δ , ϵ).

Exemplo 4

Estabelecimento de linhas celulares permanentes de linhas de hibridoma não produtoras, através de electroporação com plasmídeos de expressão para as cadeias quimerizadas de MAK179.

Os plasmídeos pK chim. e p $\gamma 1$ chim. foram misturados em quantidades iguais e transfectados através de electroporação (gene-Pulser de BioRad) na linha de hibridoma não produtora de imunoglobulina Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 8923) (Ochi, A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983), 6351-6355). Também são apropriadas todas as outras linhas celulares de hibridoma não produtoras de imunoglobulina como, por exemplo, P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 8375). Antes da transfecção, ambos os plasmídeos foram linearizados por meio da endonuclease de restrição PvuI. A realização da electroporação é descrita em Nucleic Acids Res. 15 (1987) 1311-1326 e em Bio Techniques 6 (1988) 742-751. Após a separação por centrifugação, as células foram lavadas com tampão HeBS frio (HEPES 20 mmol/l, pH 7,05, NaCl 137 mmol/l, KCl 5mmol/l, Na₂HPO₄ 0,7 mmol/l, dextrose 6mmol/l), ressuspensas em tampão HeBS, ajustadas a uma concentração de 10⁶ células/ml, e colocadas sobre gelo. Após a adição dos plasmídeos aplicaram-se impulsos (condições: capacidade de 500 μ F e uma tensão entre 240 e 280 V, ou, a 160 μ F e 200 a 240 V). Após a aplicação dos impulsos, as células foram mantidas durante cerca de 10 minutos sobre gelo e, a seguir, incubadas em meio I (RPMI 1640, 10 % de soro fetal de vitela, glutamina 2 mmol/l, piruvato de sódio 1 mmol/l, aminoácidos não essenciais 0,1 mmol/l) a 37°C. Substituiu-se o meio 30 horas após a transfecção, e foi feita uma incubação com o meio I + G418 800 μ g/ml, depois de terem sido semeadas cerca de 10³ células por ca-



da alvéolo de placas de microtitulação de 96 alvéolos. No total, foram preparadas 10 placas de microtitulação (96 alvéolos cada uma). Ao fim de 7-10 dias, puderam ser identificadas, nos alvéolos, colônias resistentes a G418. As soluções sobrenadantes das suas culturas foram testadas em MAK179, quimerizadas, reconstituídas, como se descreve no exemplo seguinte. Os melhores produtores foram multiplicados em grande escala no meio I.

Exemplo 5

Determinação de um anticorpo reconstituído contra o receptor de IL2 humano

Em primeiro lugar, reveste-se uma placa de microtitulação com anticorpos policlonais contra Fc γ humano. Para este fim, são incubados os alvéolos de uma placa de microtitulação com 200 μ l, correspondendo a 2,5 μ g, de um anticorpo policlonal contra Fc γ (IgG) humano em carbonato/bicarbonato 0,2 mol/l, pH 9,5, durante a noite a 4°C ou durante uma hora à temperatura ambiente. Após uma aspiração dos alvéolos, fez-se uma incubação com 300 μ l de HEPES 50 mmol/l, NaCl 1 % de proteína C 0,15 mol/l, pH 7,0, durante 30 minutos a 1 hora à temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 200 μ l de solução de calibração ou solução sobrenadante das culturas de células transfectadas e fez-se uma incubação de 1 hora à temperatura ambiente com agitação (500 rpm) ou de 90 minutos à temperatura ambiente sem agitação. A curva de calibração foi elaborada com um modelo quimérico (produzido quimicamente através da formação de pontes de MAK IgG humano e fragmentos Fab de MAK179). Após uma aspiração dos alvéolos, fez-se duas vezes uma lavagem com 300 μ l de IP = tampão de incubação (HEPES 50 mmol/l, pH de 7,0, NaCl 0,15 mol/l, tartarato dissódico 0,2 mol/l, 1 % de proteína C, 0,75 % de PEG 40.000 (Serva), 0,5 % de Pluronic F68 (Boehringer Mannein), 0,01 % de fenol). A seguir foram adicionados 200 μ l de solução de complexo conjugado de IL-2-receptor-POD-anticorpo (ver abaixo) e fez-se uma incubação de 1 hora à temperatura ambiente sob agitação (500 rpm) ou de 90 minutos à temperatura ambiente sem agitação. O complexo pré-produzido consiste em receptor de interleucina 2 solúvel e fragmentos Fab, marcados por POD, do receptor de IL 2 MAK215.



Produção da solução do complexo: 20 µl dos fragmentos Fab, marcados por POD, de MAK 215 (150 U/ml) + 19,5 ml de tampão de incubação IP (ver acima) + 3 ml de receptor de IL 2 solúvel padrão (6400 U/ml; unidades definidas através do padrão de T-cell Sciences). O receptor de IL 2 solúvel foi obtido a partir das soluções sobrenadantes de culturas da linha celular de fibroblastos de rato descrita por Shimizu et al. (Mol. Biol. Med. 3 (1986) 509-520). Após a realização da incubação fez-se 3 vezes uma lavagem com o tampão de lavagem acima descrito, e a seguir, foi determinada a actividade de POD por meio da solução de ABTS [sulfonato de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolino] + H₂O₂, após uma incubação de 45-60 minutos à temperatura ambiente, pela leitura da extinção a 405 nm, num leitor ELISA. De acordo com este método, foram determinados clones com alta expressão (até 10 µg/ml).

REIVINDICAÇÕES

1 - Processo para a produção de um ADN recombinante que codifica a cadeia leve ou pesada de um anticorpo em que as regiões constantes são de origem humana e as regiões variáveis são de origem não humana, e que apresenta na direcção da transcrição,

(a) uma sequência de ADNc que codifica a região variável não humana, inclusivé a região J e, eventualmente, a D,

(b) uma sequência de intrão que apresenta, no seu terminal 5', um local doador da união (splice-donor), e a qual se compõe de uma sequência parcial de intrão não humana, no seu terminal 5', e de uma sequência parcial de intrão humana, no seu terminal 3', e

(c) uma sequência de ADN genómica que codifica a região constante humana, caracterizado por se isolar poliA^+ -ARNm, a partir de uma linha de células de hibridoma, que segrega um anticorpo de especificidade desejada, se produzir uma biblioteca de ADNc, correspondente, em vectores apropriados, examinando-a, por hibridação com oligonucleótidos complementares ao ADN que codifica a parte constante do anticorpo, para identificar clones que contenham o ADNc para cadeias de anticorpos, por se isolar a partir daí as sequências V, J e, eventualmente, a D, introduzindo a seguir, através de mutagénese dirigida, no respectivo domínio J, na direcção da transcrição, um local doador da união (splice-donor), uma parte de uma sequência de intrão de anticorpo de origem não humana, e um sítio de restrição, e se separarem pela digestão com a respectiva enzima de restrição, as sequências que codificam a região constante, e se ligar o ADN obtido a uma sequência de ADN genómica, que codifica a região constante da cadeia leve ou pesada de um anticorpo humano e que apresenta, no seu terminal 5', uma parte de uma sequência de intrão humano correspondente.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por se utilizar uma linha de células de hibridoma de rato ou ratzana.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado



por se utilizar uma célula de hibridoma de rato, que segrega um anticorpo dirigido contra o receptor da interleucina 2.

4 - Processo de acordo com as reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado por se introduzir uma sequência de intrão de anticorpo de origem não humana, com 15 a 20 pb.

5 - Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por se introduzir uma parte do intrão que se segue naturalmente à sequência de ADN genómica de origem não humana.

6 - Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por se introduzir, como local doador da união (splice-donor), a sequência de nucleótidos GT.

7 - Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado por se utilizar um ADN de intrão humano, que apresenta um local ramificado ("branch-site").

8 - Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado por se juntar, no terminal 5' da última sequência de ADN obtida, uma sequência de promotor, ou por se realizar a manipulação num vector que contém um promotor na posição apropriada.

9 - Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por se utilizar como promotor o promotor do genoma do citomegalovírus.

10 - Processo de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por se utilizar uma sequência de ADN genómica humana que codifica a região constante da cadeia pesada de um anticorpo do tipo IgG.

11 - Processo para a produção de um vector de expressão, caracterizado por se inserir num vector apropriado para a expressão de um gene estranho, um ADN recombinante produzido de acordo com uma das reivindicações 1 a 10.



12 - Processo para a produção de um anticorpo quimérico cujas regiões variáveis são de origem não humana e cujas regiões constantes são de origem humana, caracterizado por se introduzirem, um de cada vez, um vector de expressão que contém um ADN recombinante produzido de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, o qual codifica a cadeia leve e um vector de expressão que contém um ADN recombinante produzido de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, o qual codifica a cadeia pesada do anticorpo, numa célula hospedeira apropriada, por se isolarem transformantes estáveis, e por se obter o anticorpo a partir do sobrenadante da cultura das células.

13 - Processo para a produção de um anticorpo quimérico de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se utilizarem, como células hospedeiras, células de hibridoma não produtoras ("non-producer").

14 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se utilizar a linha de células Sp2/O-Ag14 (ATCC CRL 8923).

15 - Processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado por se introduzirem, na célula hospedeira, os vectores pK quim. e p quim.

16 - Processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 15, caracterizado por se introduzir os vectores por electroporação.

17 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se produzir o anticorpo quimérico MAK 179.

18 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se produzir o anticorpo quimérico MAK 215.

19 - Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado por se produzir o anticorpo quimérico MAK 447.

72 675

int.Nr. 3132/04/PT

-25-

Lisboa, -7. JUN. 1991

Por BOEHRINGER MANNHEIM GmbH

=O AGENTE OFICIAL=

O ADJUNTO

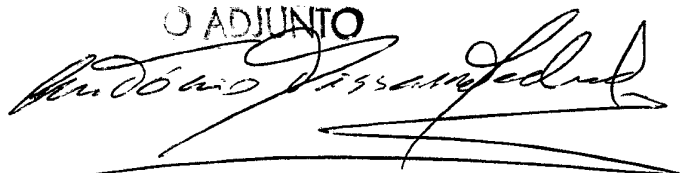
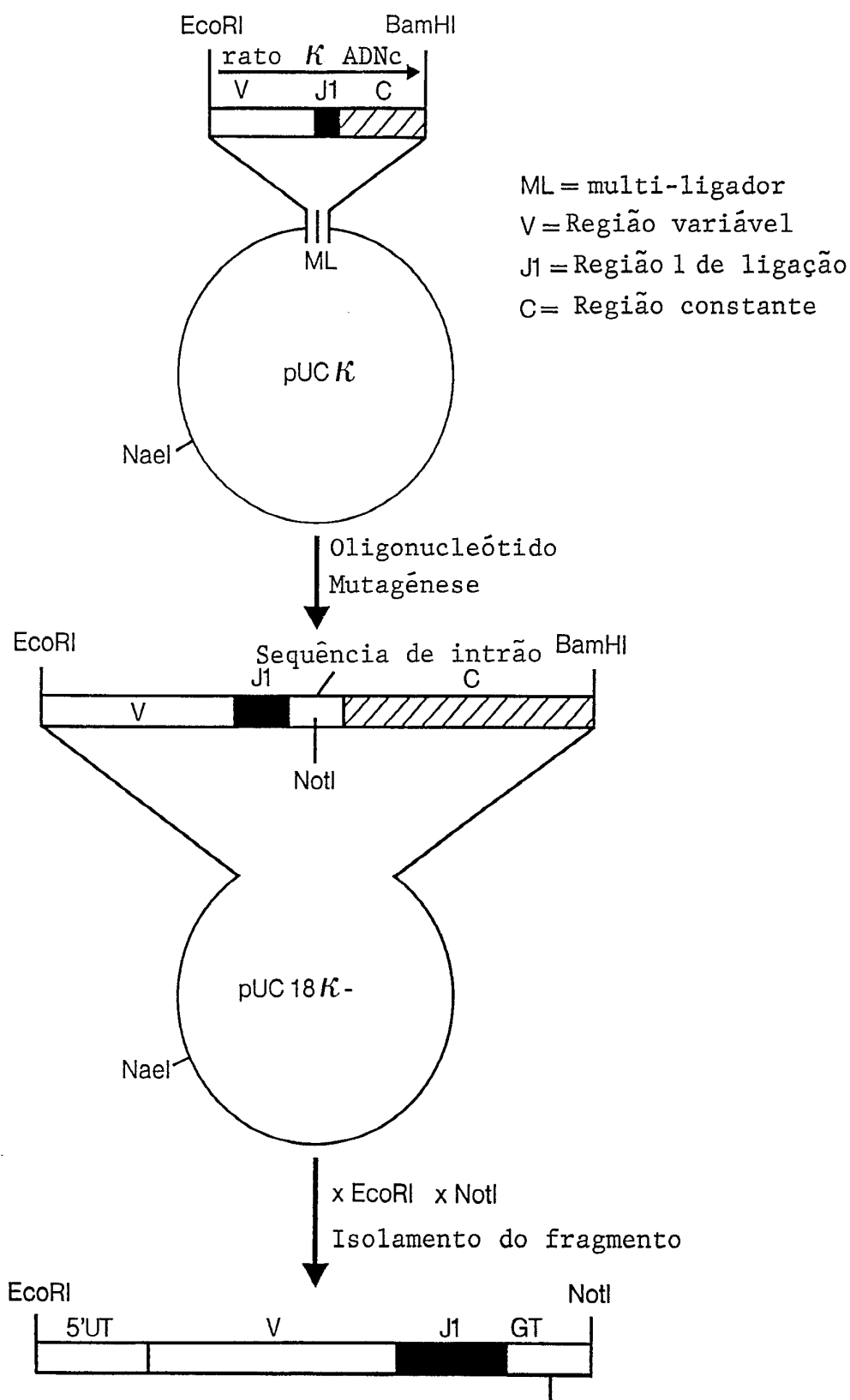
A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'António Passarinho', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the right.

Fig.1



5'UT = Região 5' não traduzida



Fig. 2a

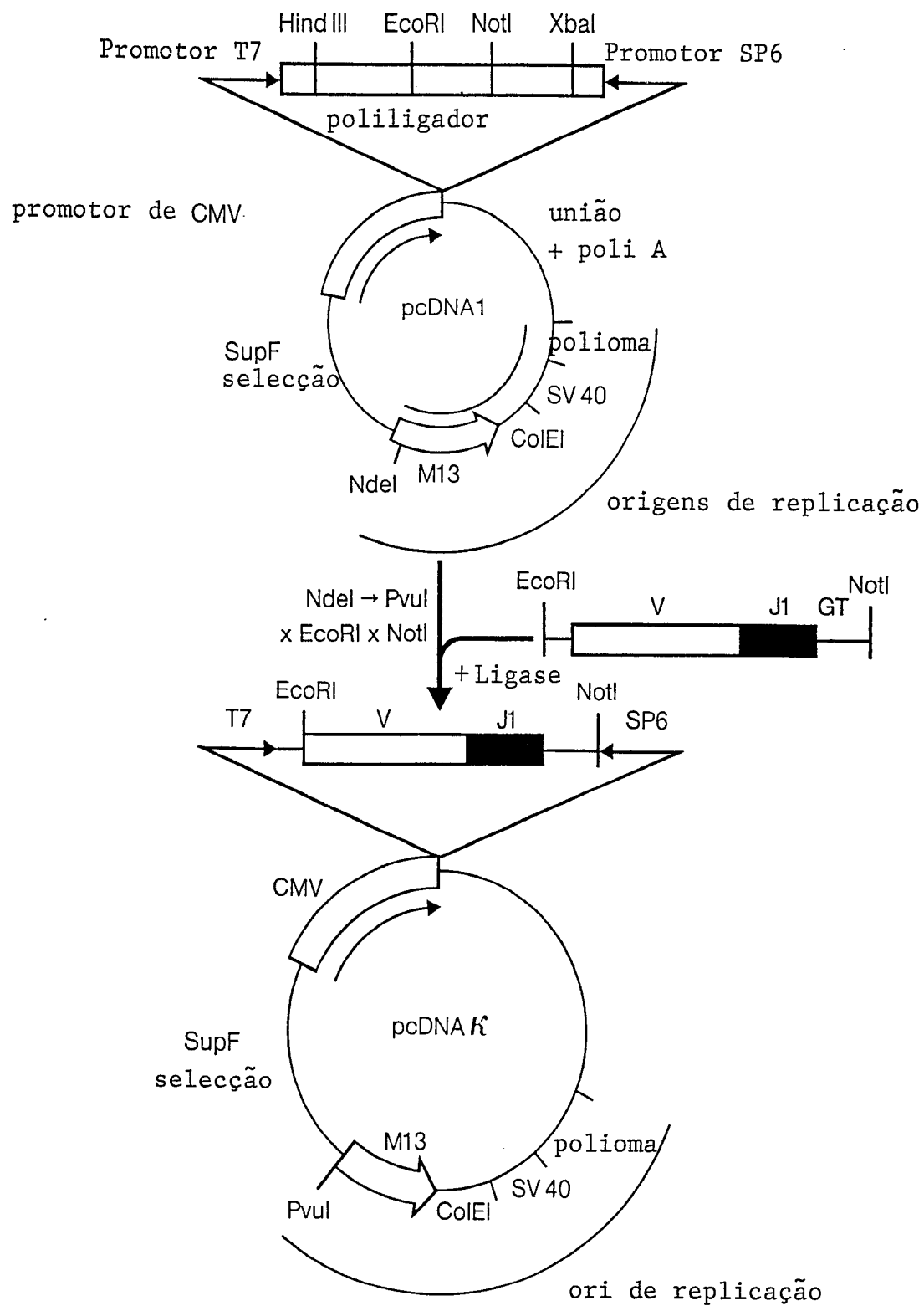


Fig. 2b

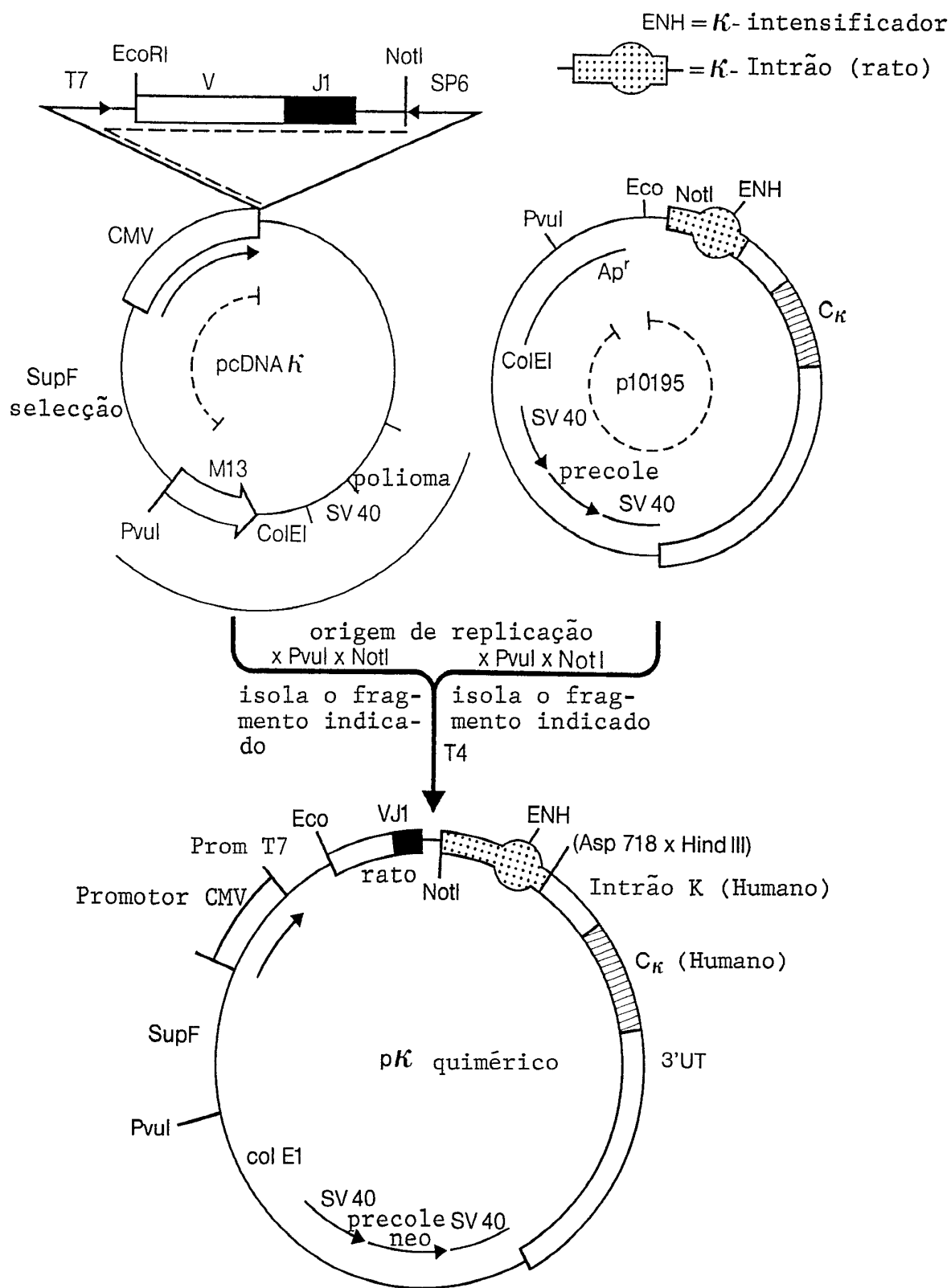


Fig.3

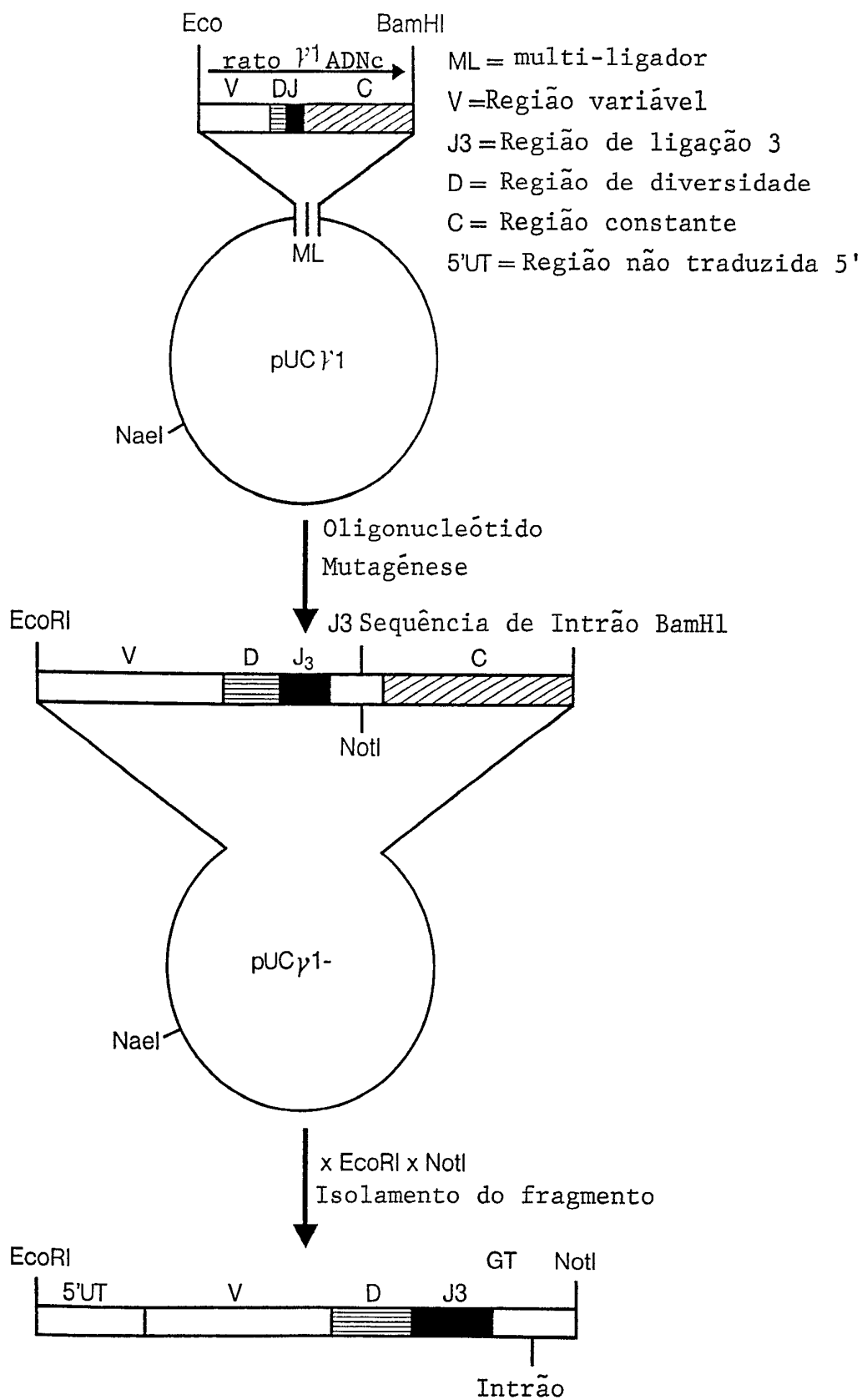


Fig. 4a

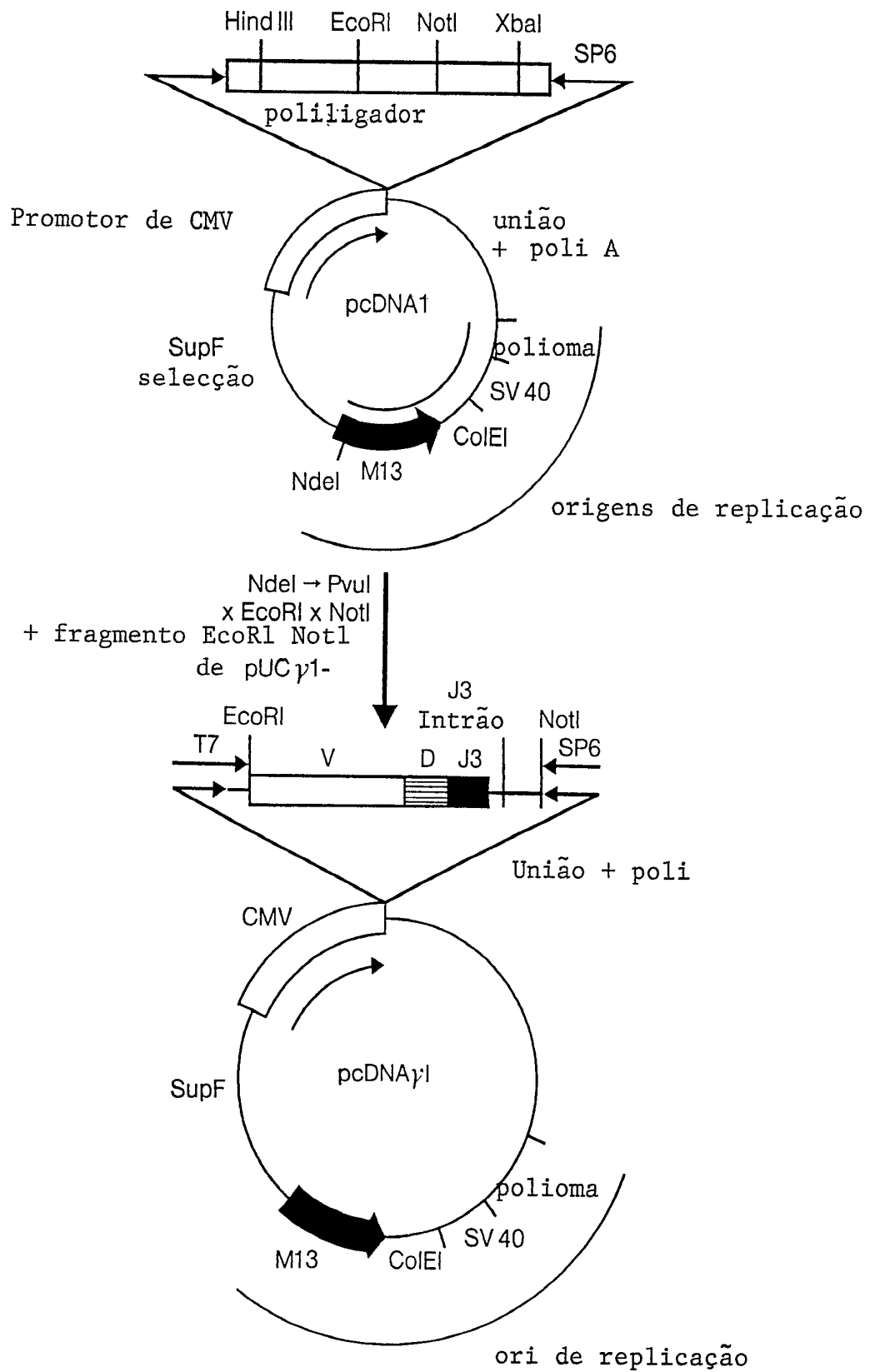


Fig. 4b

ENH= Intensificador

—●— = Intrão da cadeia pesada (rato)

