



(10) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 91294 B

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

C07K015/06	A	C12P021/00	B
A61K037/02	B	C12P021/00	C
C12N015:12	C	C12N015:62	C

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.07.27	(73) <i>Títular(es):</i> BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT - D-3550 MARBURG/LAHN DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.07.28 DE 3825615	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.02.08	(72) <i>Inventor(es):</i> KLAUS BOSSLET DE GERHARD SEEMANN DE HANS HARALD SEDLACEK DE
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 08/94 1994.08.17	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONSTRUTOS DE ANTIGENES A PARTIR DE ANTIGENES DA CLASSE I DE COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL COM MOLÉCULAS DE SUPORTE ESPECÍFICAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS QUE OS CONTÊM

(57) *Resumo:*

[Fig.]

**DESCRIÇÃO**  
**DA**  
**PATENTE DE INVENÇÃO**

**N.º 91 294**

**REQUERENTE:** BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã.

**EPÍGRAFE:** " PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONSTRUTOS DE ANTIGENES A PARTIR DE ANTIGENES DA CLASSE I DE "COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL " COM MOLÉCULAS DE SUPORTE ESPECÍFICAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTEM "

**INVENTORES:** Dr.Gerhard Seemann, Dr.Klaus Bosslet e Dr.Hans Harald Sedlacek.

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

República Federal Alemã, em 28 de Julho  
de 1988, sob o nº. P 38 25 615.0.

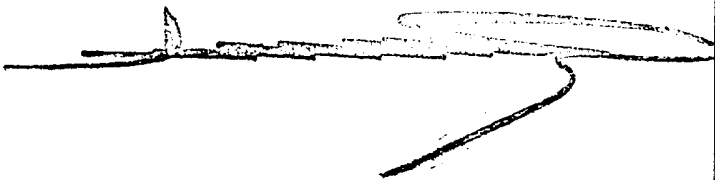
Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, República Federal Alemã, (inventores: Dr. Gerhard Seemann, Dr. Klaus Bosslet e Dr. Hans Harald Sedlacek, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONSTRUTOS DE ANTIGENES A PARTIR DE ANTIGENES DA CLASSE I DE "COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL" COM MOLÉCULAS DE SUPORTE ESPECÍFICAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÉM".

Descrição

A presente invenção refere-se a construtos de antígenos que resultam do acoplamento de "complexo de histocompatibilidade principal" (MHC) da classe I com moléculas de suporte específicas.

As reacções de rejeição dos tecidos são as reacções imunes provocadas por células T mais fortes que são conhecidas. Em indivíduos da mesma espécie, elas são provocadas por diferenças alogénicas dos antígenos MHC da classe I e da classe II.

Nas transplantações de órgãos, por exemplo os determinantes alogénicos eventualmente existentes dos antígenos MHC do tecido dador são reconhecidos pelas células T




alo-específicas do receptor como estranhas, é provocada uma resposta imune por células T e obtém-se a reacção de rejeição desde que não se utilize uma terapia imuno-supressora ou esta não seja suficiente.

Sabe-se ainda que os antígenos da classe I de MHC são glicoproteínas que se manifestam na superfície de todas as células que contêm núcleo. Elas consistem numa cadeia pesada que é codificada pelos genes da classe I de MHC e por uma cadeia leve, a B<sub>2</sub>-microglobulina que está associada não covalentemente com a cadeia pesada.

A parte extracelular das cadeias pesadas está dobrada em três domínios, dos quais os dois primeiros domínios (alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub>) em comparação com as sequências de aminoácidos até agora conhecidas os antígenos de MHC da classe I de diferentes indivíduos apresentam um polimorfismo marcado. Eles servem para a apresentação dos antígenos e possuem os determinantes allogénicos. O terceiro domínio extracelular possui uma sequência conservante. A associação com microglobulina B<sub>2</sub> é essencial para uma correcta dobragem da cadeia pesada e para o transporte da molécula para a superfície das células.

O isolamento e a caracterização de antígenos da classe I de MHC mutados mostrou que, para a provocação de uma reacção de rejeição, já bastam pequenas diferenças de aminoácidos nos domínios de alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub> entre o doador e o receptor (Nathenson e col., Ann. Rev. Immunol., 1986, 4, 471 - 502).

Mesmo em seres humanos, verificou-se que pequenas diferenças entre o doador e o receptor originam a rejeição de um transplante (J. Dausset, F. T. Rapaport, L. Legrand, J. Colombani e A. Marcelli-Barge: Skin allograft




survival in 238 human subjects: Role of specific relationships at the four gene sites of the first and the second HL-A loci, Histocompatibility Testing (1970), páginas 381 - 397, Terasaki P. I. (ed.). Do que se disse anteriormente, chega-se à conclusão de que, para utilizar a indutibilidade específica e a intensidade da resposta imune das células na reação de transplantação de tecidos é possível para perturbar ou destruir as células pretendidas.

A Requerente descobriu que se podem acoplar suportes específicos das células pretendidas, por exemplo de preferência, anticorpos monoclonais (MAK), mas também anticorpos policlonais ou em moléculas que se ligam a receptores existentes nas células na extremidade terminal N ou C de uma molécula da classe I de MHC alogénico sem que se alterem prejudicialmente os determinantes alogénicos.

Com o auxílio deste suporte específico da célula pretendida, a molécula da classe I de MHC é trazida especificamente para as células pretendidas, o que irigina a activação de células T alo-específicas e, por consequência, há a destruição das células pretendidas por células T citotóxicas alo-específicas.

Um esclarecimento para a razão do acoplamento de um suporte específico da célula pretendida na extremidade terminal N ou C de uma molécula da classe I de MHC com obtenção dos determinantes alogénicos baseia-se no facto de que a extremidade terminal N da molécula da classe I da MHC fique no lado pretendido para a célula dos domínios alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub>, enquanto os determinantes alogénicos se encontram sobre o lado voltado para a célula dos domínios alfa<sub>1</sub> e alfa<sub>2</sub> (Figura 1, Figura 34).

Por causa do grande polimorfismo dos antígenos na classe I de MHC existente na população humana, con-




segue-se provocar uma reacção de rejeição com o auxílio de apenas duas moléculas da classe I de MHC diferentes escolhidas, por exemplo, HLA B27w e HLA B27k, em cerca de 100% da população. HLA B27w e HLA B27k são dois subtipos definidos por T-linfócitos citotóxicos da especificidade serológica definida HLA B27. Na população caucasóide, cerca de 7% dos indivíduos possuem HLA B27w e cerca de 1% possui HLA B27k.

Pela utilização, por exemplo, dos dois subtipos de HLA B27 para a alogeneização correspondente à presente invenção, pode tratar-se quase 100% da população caucasóide. No entanto, de acordo com a presente invenção, pode acoplar-se cada um dos antígenos da classe I de MHC ao suporte específico pretendido se o acima mencionado antígeno do doador que interessa não origine a activação de células T alo-específicas e o subsequente prejuízo, por exemplo, a destruição das células pretendidas.

Como células alvo no organismo, pode não só tratar-se de células não pretendidas e/ou de células que provocam doenças, como, por exemplo, células de tumores. Os construtos de antígenos de acordo com a presente invenção são, por consequência, apropriados para a terapia de tumores. No entanto, também outras doenças, que são provocadas por células ou pelos seus produtos e são influenciadas favoravelmente por eliminação destas células, podem ser submetidas a terapia com os construtos de antígenos da classe I de MHC de acordo com a presente invenção.

A maneira de actuação das moléculas híbridas descritas nos grupos de exemplos I e II baseia-se no facto de estas poderem ligar-se a um antígeno que existe nas células por causa da especificidade do componente dos anticorpos. Devido a parte de HLA B27 da molécula de fusão, a superfície das células pretendidas é mascarada com uma molécula alogénica da classe I de MHC. Estas moléculas alogéni-




cas da classe I podem então ser reconhecidas por células T citotóxicas alo-específicas, o que origina a destruição das células pretendidas pelas células T citotóxicas alo-específicas.

A presente invenção refere-se, por consequência a

- a) antígenos da classe I de MHC que são acoplados no terminal N ou C com suportes específicos, em que o acoplamento, de preferência, se realiza covalentemente, mas também não covalentemente, por exemplo, por pontes de biotina-avidina e em que suportes específicos se ligam selectivamente às células alvo, elas constituem de preferência, não só anticorpos monoclonais mas também policlonais, no entanto, são moléculas completamente gerais que ligam o receptor que ligam aos respectivos receptores da célula;
- b) processo para a preparação dos construtos de antígenos da classe I de MHC e
- c) utilização dos construtos de antígenos da classe I de MHC mencionados em a) e em b) para a destruição ou eliminação de células pretendidas.

A invenção é ainda descrita nos seguintes Exemplos e nas reivindicações da patente, mas em que não se limita a esses exemplos.

Os Exemplos 1 - 17 que se descrevem seguidamente referem-se a um construto de acordo com a presente invenção obtido a partir de  $\text{mAK B/1-8 V}_H\text{-Gen (1)}$  de rato específico ao nitrofenol (NP), a um  $\text{IgG C-F (ab')}_2\text{ Gen (2)}$  humano e a um gene HLA B27w (3). (1) e (2) são, por exemplo, previstos para a parte do suporte específica - neste caso,



MAK contra NP - enquanto (3) é antigene da classe I HLA.

O construto acima mencionado é expresso depois da correspondente transformação de tais células de mieloma e seu seccionamento, os quais contém uma microglobulina B<sub>2</sub> humana e uma cadeia leve de uma imunoglobulina, cujo gene V forma com V<sub>H</sub> B/1-8 um sítio de ligação NP, como, por exemplo, as células de mieloma de rato J 558 L (V. T. Oi, S. L. Morrison, L. A. Herzenberg e P. Berg : Immunoglobulin gene expression in transformed lymphoid cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 825, 1983). Por troca do gene V<sub>H</sub> da cadeia pesada e utilização de uma correspondente cadeia leve, pode dotar-se o produto de fusão MAK/HLA B27w com qualquer especificidade pretendida, para um MAK específico ou selectivo.


#### EXEMPLCS

I Os Exemplos 1 a 13 referem-se à construção de um gene de fusão HLA B27/MAK com o componente HLA B27 na extremidade 3' do anticorpo monoclonal.

A) Preparação do componente MAK C-Gen (IgG<sub>3</sub> C-Gen).

#### Exemplo 1

Isolou-se um IgG<sub>3</sub> C-gen humano de um banco de genes humanos em fagos EMBL3 (A.-M. Frischauf, H. Lehrach, A. Proustka, N. Murray : Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170, 827 - 842 (1983) e G. H. A. Seemann, R. S. Rein, C. S. Brown, H. L. Ploegh : Gene conversion-like mechanisms may generate polymorphism in human class I genes. The EMBO Journal 5, 547 -



552 (1986)) e são subclonados no vector de plasmídeo pUC19 como fragmento de HindIII/SphI com 3,1 kb de tamanho (Clone 54.1.24) (Figura 2).

Todas as técnicas utilizadas neste Exemplo e nos Exemplos seguintes, quando não se indica outra coisa, são retiradas de T. Maniatis, E. F. Fritsch, H. Lehrach e A.-M. Frischauf, Laboratory Manual EMBL (1982), Heidelberg; J. Sambrook : Molecular Cloning : A laboratory manual (1982) Cold Spring Harbour Laboratory.

### Exemplo 2

O clone 54.1.24 foi submetido a uma digestão de restrição completa com HindIII e parcial com PstI. Assim, obtêm-se, entre outros fragmentos de restrição, o exão  $C_{H1}$  e um, dois ou três "exões hinge". Estes fragmentos foram separados com gel de agarose e clonados num vector pUC19 cortado com HindIII e PstI (Figura 3).


O clone do plasmídeo com o  $C_{H1}$  e três "exões de articulação" ( $(F(ab')_2)_{3H}$ ) foi em seguida separado com BamHI e Asp718, os sítios de corte foram preenchidos e religados com  $T_4$  ligase (Figura 4). Assim, o poligador pUC19 é suprimido entre os pontos de corte de XbaI e SstI.

### I B) Preparação do Gene HLA B27

### Exemplo 3

Isolou-se um gene HLA B27w de um banco de genes genómico clonado em bacteriofagos EMBL3 (A.-M. Frischauf, a. a. O. e G. H. A. Seemann, a. a. O) e caracterizou-se por formação do mapa de restrição e por análise da se-





da América) (Figura 8).

#### Exemplo 7

Preparam-se fagos de cadeia única de KS+ vector plasmídeo C' por infecção com fagos auxiliares VCS-M13 (Stratagene, Número de Catálogo 200251) e purificou-se (Stratagene : Bluescript Exo/Mung DNA sistema de sequenciamento : Manual de Instruções). Com estas cadeias individuais hibrizou-se um oligonucleótido sintético (I = 5'CCTTACCTCATCTCAGG3') e sintetizou-se a parte restante da segunda cadeia com o auxílio de polimerase de Klenow. Depois da transformação do plasmídeo de cadeia dupla produzido desta maneira nas bactérias XL-Blue, produziram-se pelos clones de plasmídios assim obtidos de novo por infecção com fagos de cadeia única auxiliares e determinou-se com o auxílio de um primário de oligonucleótido II (5'TGAGGGCTCCTGCTT3') a sequência de nucleótidos (F: Sanger e col., a. a. O.). Fez-se a mutação de um clone em que o codão TGG (aminoácido 274) na extremidade 3' do exão alfa<sub>3</sub> foi mudado no codão de interrupção (TGA), foi identificado (G<sup>u</sup>) (Figura 9).

#### Exemplo 8

Partiu-se o plasmídeo com o fragmento A' com SstI e ligou-se o fragmento C" isolado depois da separação sobre um gel de agarose e produzido com ele por meio de uma eliminação completa com HindIII e parcial com SstI do clone de plasmídeo C". Depois da ligação durante trinta minutos a 14<sup>o</sup> C, preencheram-se as extremidades não ligadas com T<sub>4</sub> polimerase e, em seguida, ligou-se mais uma vez. Por restabelecimento do mapa de restrição, identificou-se o plasmídeo D (Figura 10), no qual o fragmento A' está ligado com o fragmento C" através do sítio de corte SstI no exão alfa<sub>2</sub>.

**BAD ORIGINAL**

### Exemplo 9

Foi separado com xbaI o plasmídio com o fragmento B' que foi cortado com xbaI a partir do plasmídio B' e purificou-se depois da separação num gel de agarose (Figura 11). Com o auxílio da análise de sequência de nucleótidos (17), identificou-se um plasmídio (E), no qual o fragmento B' está ligado na orientação 5' - 3' correcta no fragmento D.

C) Fusão do Gene HLA B27w Modificado com o Fragmento do Gene IgG3 C F (ab')<sub>2</sub> 3H

### Exemplo 10

O fragmento E foi cortado por uma eliminação com EcoRI e HindIII a partir do plasmídio E, as extremidades foram preenchidas com T<sub>4</sub> polimerase e depois da separação purificou-se com um gel de agarose. Este fragmento E assim purificado foi depois ligado com o plasmídio que contém o fragmento IgG3 F(ab')<sub>2</sub> 3H, depois do que se separa este com xbaI e as extremidades xbaI foram preenchidas com T<sub>4</sub> polimerase (Figura 12). Por estabelecimento do mapa por restrição, foi identificado o clone que continha o plasmídio F, no qual o gene HLA B27w modificado está fusionado com o gene F(ab')<sub>2</sub> 3H na orientação 5' - 3' correcta.

### Exemplo 11

Cortou-se o fragmento F com HindIII e EcoRI para se colocar um poliligador antes da extremidade 5' do fragmento F. As extremidades HindIII e xbaI foram preenchi-

~~CONFIDENTIAL~~

das com  $T_4$  polimerase e clonadas num pUC19, separadas com SstI e as suas extremidades SstI foram preenchidas com  $T_4$  polimerase. Por análise de restrição, identificou-se o clone com o plasmídeo G que possui na extremidade 5' do fragmento F o poliligador pUC19 (Figura 13).

#### Exemplo 12


Separou-se o plasmídeo G com HindIII e EcoRI, isolou-se o inserto com o gene de fusão IgG F(ab')<sub>2</sub> HLA B27w e clonou-se num Bluescripto separado com HindIII e EcoRI vector do plasmídeo KS+ (Stratagene : Bluescript Exo/Mung DNA sequencing system : Instruction Manual) (Figura 14).

#### Exemplo 13

O plasmídeo H que resulta desta clonação foi em seguida separado com BamHI e clonou-se o inserto no vector de expressão eucariótico cortado com BamHI pEV<sub>H</sub> (T. Simon, K. Rajewsky, Nucl. Acids Res. 16, 354 (1988)), o qual continha as sequências promotoras/reforçadoras IgG H e o gene VH que deriva de MAK B/1-8 de rato específica a NP (Figura 15) (M. N. Neuberger : EMBO Journal 2, 1375 - 1378 (1983)). Por análise de restrição, identificou-se o plasmídeo I, em que o gene de fusão IgG 3 F(ab')<sub>2</sub> HLA B27w está clonado com orientação 5' - 3' correcta por detrás do gene V<sub>H</sub>.

O gene de fusão MAK/HLA B27w possui agora as extremidades 5' e 3' intactas com todos os sinais necessários para a expressão em células eucarióticas. O construto é, como se disse já atrás, expresso em cada célula de mieloma e cortado, que contém uma E<sub>2</sub>-microglobulina humana e uma cadeia leve de uma imunoglobulina, cujo gene V com V<sub>H</sub> B/1-8 forma um sítio de ligação NP, por exemplo, a célula de mieloma de





pla separado com SstI e HindIII. O clone M13 Cl' com o fragmento Cl' foi identificado por determinação da sequência dos ácidos nucleicos do inserto (Figura 17).

Do fago Cl' M13 mpl8 isolaram-se os fagos de cadeia única da estirpe de bactérias CJ236 de acordo com o protocolo do estojo de mutagênese Bio-Rad Muta-Gene M13, que continham uracilos. Nestes fagos de cadeia única, hibridizou-se um oligonucleótido (oligonucleótido III) com a sequência 5'GCGCGCTGGAGCGTCTC3' e, com a adição de T<sub>4</sub> polimerase, dNTP e T<sub>4</sub> ligase, sintetizou-se a segunda cadeia.


Depois da infecção da estirpe de bactérias MV1190, identificou-se o clone C2 mudado por análise de restrição dos ADN de dupla cadeia M13 mpl8 e trataram-se por análise de sequência de ácido nucleico (Figura 18). Pela mutagênese, destruíram-se os sítios de restrição de corte com PstI no exão alfa2 sem alterar o rasto de leitura ou a sequência de aminoácidos codificada.

Pelo clone C2 M13, foram produzidos de novo fagos de cadeia única da estirpe de bactérias CJ236 e hibridizou-se com o oligonucleótido IV (oligonucleótido IV = 5'GGGGACGGTGGAAATTCGAAGACGGCTC3'). Em seguida, sintetizou-se a segunda cadeia com T<sub>4</sub> polimerase, T<sub>4</sub> ligase e dNTP. Depois da transformação em bactérias MV1190, identificou-se o clone C2' M13 mpl8 por análise de restrição e verificou-se que se tratava da mutação correcta por análise das sequências de nucleótidos (Figura 19). Por meio desta mutagênese, introduziu-se no exão TM do gene HLA B27 um sítio de corte com EcoRI e com AsuII e modificou-se o aminoácido 279 de glutamina para asparagina (Figura 20).

Exemplo 15







O clone de plasmídeo 54.1.24 Delta Pol foi digerido com Bgl2 e SphI. As extremidades salientes foram eliminadas com T<sub>4</sub> polimerase e religadas com T<sub>4</sub> ligase. Por análise de restrição e determinação da sequência dos ácidos nucleicos, identificou-se o clone I, que contém ainda o exão CH<sub>1</sub> do gene C IgG3 humano (Figura 26).

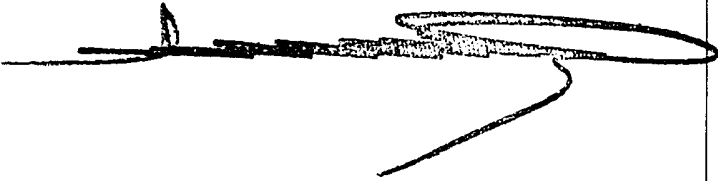
O clone de plasmídeo I foi separado com PstI e as extremidades salientes eliminadas com T<sub>4</sub> polimerase. Nas extremidades lisas assim obtidas, ligou-se o inserto B', cortado com XbaI e preenchido com T<sub>4</sub> polimerase, com obtenção de extremidades lisas. Por análise de restrição e determinação da sequência de ácidos nucleicos, identificou-se o clone K (Figura 27) que contém um exão humano IgG3 C<sub>H1</sub> e uma extremidade 3' de um gene da classe I de HLA.

O clone de plasmídeo K foi separado com HindIII e EcoRI, as extremidades salientes eliminadas e ligou-se o inserto no plasmídeo pUC19 cortado com SstI, cujas extremidades foram tornadas igualmente lisas. Identificou-se o clone L, que contém o poliligador do vector 5' de pUC19 do exão C<sub>H1</sub> (Figura 28).

O clone de plasmídeo L foi separado com EcoRI e HindIII, o inserto purificado e ligado no vector KS<sup>+</sup> cortado com HindIII e EcoRI (Stratagene : Bluescript Exo/Mung DNA Sequencing System), cujos sítios de corte com PstI foram previamente destruídos por eliminação com PstI, tratamento com T<sub>4</sub> polimerase e religação. Identificou-se o clone M a partir do qual se pode cortar o exão humano C<sub>H1</sub> com as extremidades 3' da classe I HLA por eliminação com BamHI (Figura 29).

Exemplo 17

✓  
RAD ORIGINAL



A partir do clone V M13 mp8, preparou-se ADN de cadeia dupla e separou-se com BamHI. Separou-se o clone M KS<sup>+</sup> com BamHI e purificou-se o inserto M. Ligou-se o fragmento M no clone V separado com BamHI e identificou-se o clone N com auxílio da determinação da sequência dos ácidos nucleicos de M13, o qual contém um gene de IgG3 intacto (Figura 30).

A partir do clone M13, preparou-se ADN de cadeia dupla, separou-se com EcoRI e reuniu-se o inserto. O clone de plasmídeo D<sub>1</sub> foi separado com EcoRI e ligado com o fragmento N. Isolou-se o clone fago O, no qual o fragmento N está clonado no clone D<sub>1</sub> na orientação correcta (Figura 31).


O clone de plasmídeo O foi submetido a uma eliminação completa com PstI e com eliminação parcial com EcoRI e ligou-se com o fragmento do ligador cortado do vector de plasmídeo L com EcoRI e PstI. O clone de plasmídeo P contém o gene da fusão completo HLA B27w mAκ (Figura 32, Figura 33). Este gene de fusão pode ser expresso em células humanas sozinho, ou células de rato em conjunto com o gene de microglobulina beta<sub>2</sub> e seccionado, se também existir uma cadeia pequena de imunoglobulina nas células de expressão.

#### Legenda da Figura 1

Alfa1, alfa2 e alfa3 significam os domínios da cadeia de antígenos de MHC da classe I. As setas mostram, nas hélices alfa, as que possuem alo-determinantes. CM deve significar a membrana da célula, C a célula.

#### Legenda da Figura 2 e Seguintes

EcoRI, etc, significa a separação com a



respectiva endonuclease de restrição ou o correspondente sítio de corte. BamHI/Asp718 significa um sítio de restrição destruído por religação depois do enchimento.

TM significa região de trans-membrana.

3'NT significa 3'-não transladado.

IgH p/E significa cadeia comprida de imunoglobulina-promotor/reforçador.

\* significa digestão incompleta.

DS-DNA significa : ADN de cadeia dupla.

SS-DNA significa : ADN de cadeia simples.

#### Legenda da Figura 34

s.CTL significa : linfócito T citotóxico singenético.

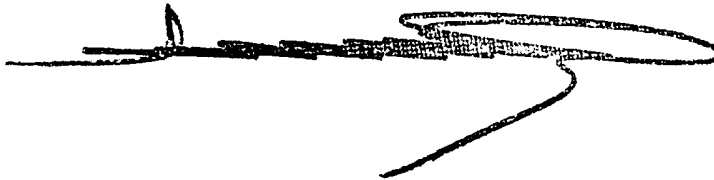
TcR significa : receptor de célula T.

a.MHC classe I significa : antigene da classe I de MHC alogénico.

t.a.a. significa : antigene associado com um tumor.

s.t.c. significa : célula de tumor singénica.

#### REIVINDICAÇÕES



- 1ª -

Processo para a preparação de construção de antígenos a partir de antígenos da Classe I de "Complexo de Histocompatibilidade Principal" ("Major Histocompatibility Complex" = MHC) e moléculas de suporte específicas, caracterizado pelo facto de se fusionarem as partes dos genes necessárias sob a forma do seu DNA, se dotarem com as sequências de regulação apropriadas e se exprimirem em sistemas de expressão apropriados.

- 2ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se ligarem as partes dos genes necessárias na extremidade 3' do gene da Classe I de MHC.

- 3ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se ligarem as partes dos genes necessárias na extremidade 5' do gene da Classe I de MHC.

- 4ª -

Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se acoplar respectivamente um antígeno da Classe I de MHC com uma molécula de suporte específica.

- 5ª -

Processo para a preparação de construtos de antígenos a partir de antígenos da Classe I de MHC e de moléculas de suporte específicas, caracterizado pelo facto de os componentes dos construtos serem acoplados por meio de ligações não covalentes.

- 6ª -

Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o acoplamento se realizar por intermédio de uma ponte de avidina-biotina.

- 7ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo facto de, como moléculas de suporte específicas, se empregarem domínios CD4.

- 8ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 ou 6, caracterizado pelo facto de, como moléculas de suporte específicas, se empregarem anticorpos monoclonais.

- 9ª -

Processo de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8, caracterizado pelo facto de se empregar o gene ou a molécula HLA B27w ou HLA B27k.

- 10ª -

Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo facto de os anticorpos monoclonais empregados serem encurtados na parte constante da cadeia pesada.

- 11ª -

Processo para a preparação de composições farmacêuticas, caracterizado pelo facto de se incorporar pelo menos um construto de antigene, quando preparado de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 com as substâncias veiculares correntes.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 28 de Julho de 1988, sob o nº. P 38 25 615.0.

Lisboa, 27 de Julho de 1989.

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE CONSTRUTOS DE ANTIGENES A PARTIR DE ANTIGENES DA CLASSE I DE "COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL" COM MOLÉCULAS DE SUPORTE ESPECÍFICAS E DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS QUE OS CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de construtos de antígenos a partir de antígenos da Classe I de "Complexo de Histocompatibilidade Principal" ("Major Histocompatibility Complex" = MHC) e moléculas de suporte específicas, que compreende fusionarem-se as partes dos genes necessárias sob a forma do seu DNA, se dotarem com as seqüências de regulação apropriadas e se exprimirem em sistemas de expressão apropriados.

BAD ORIGINAL

FIG. 1

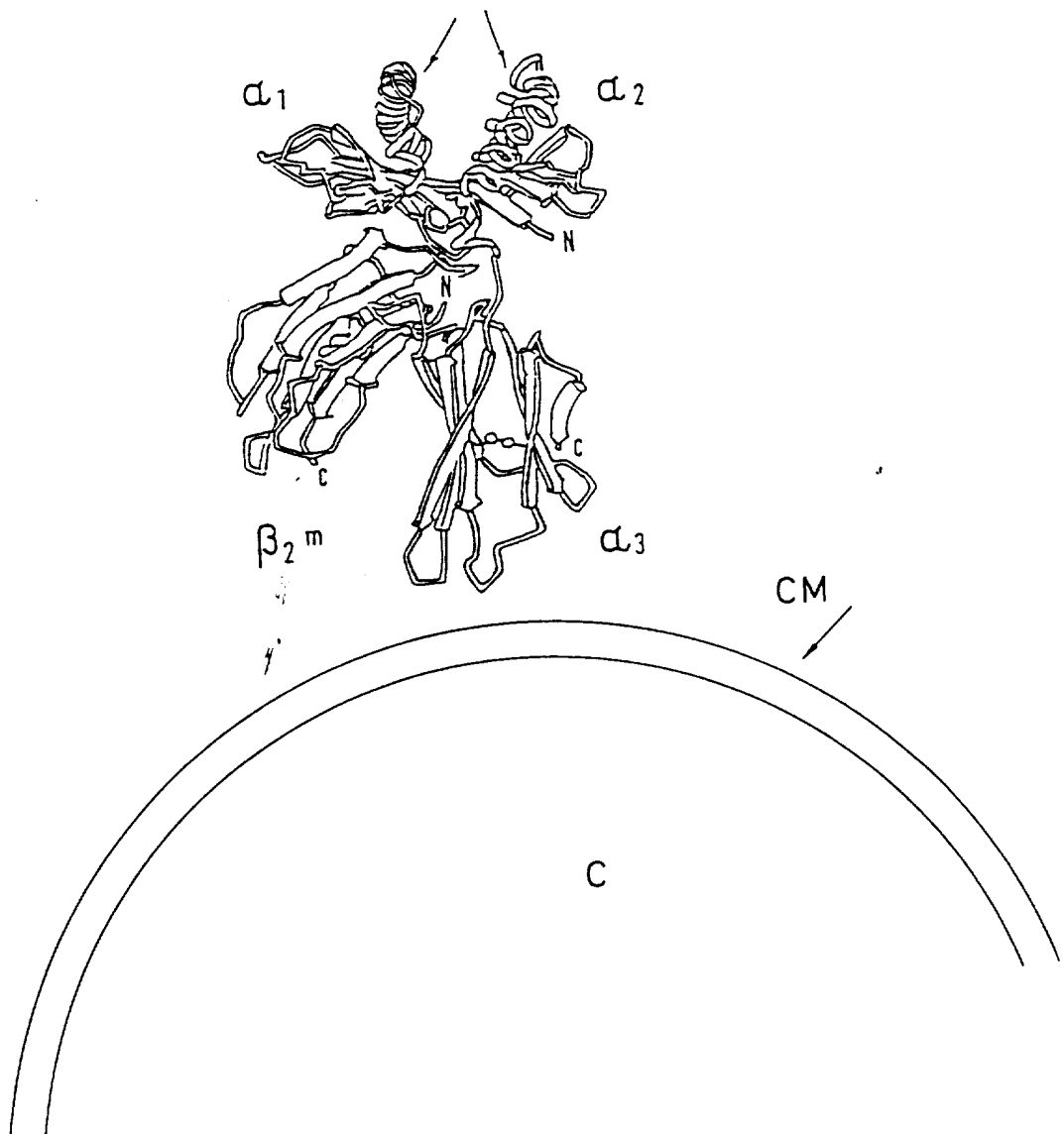
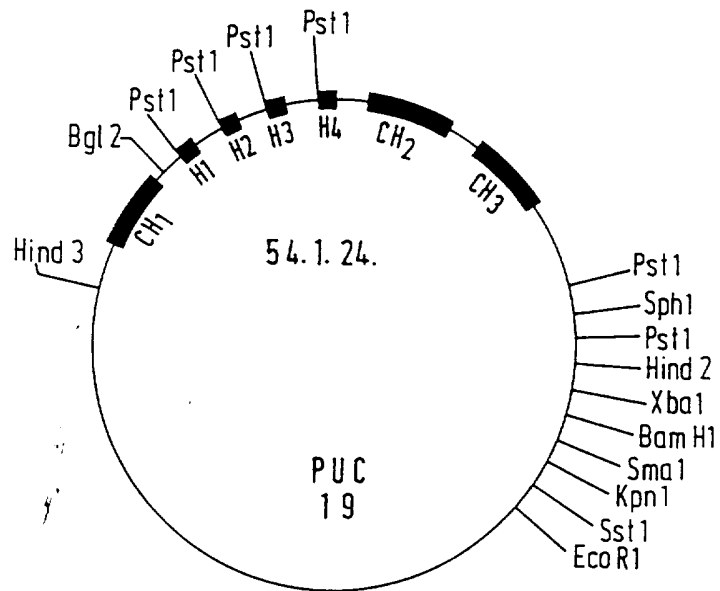


FIG. 2



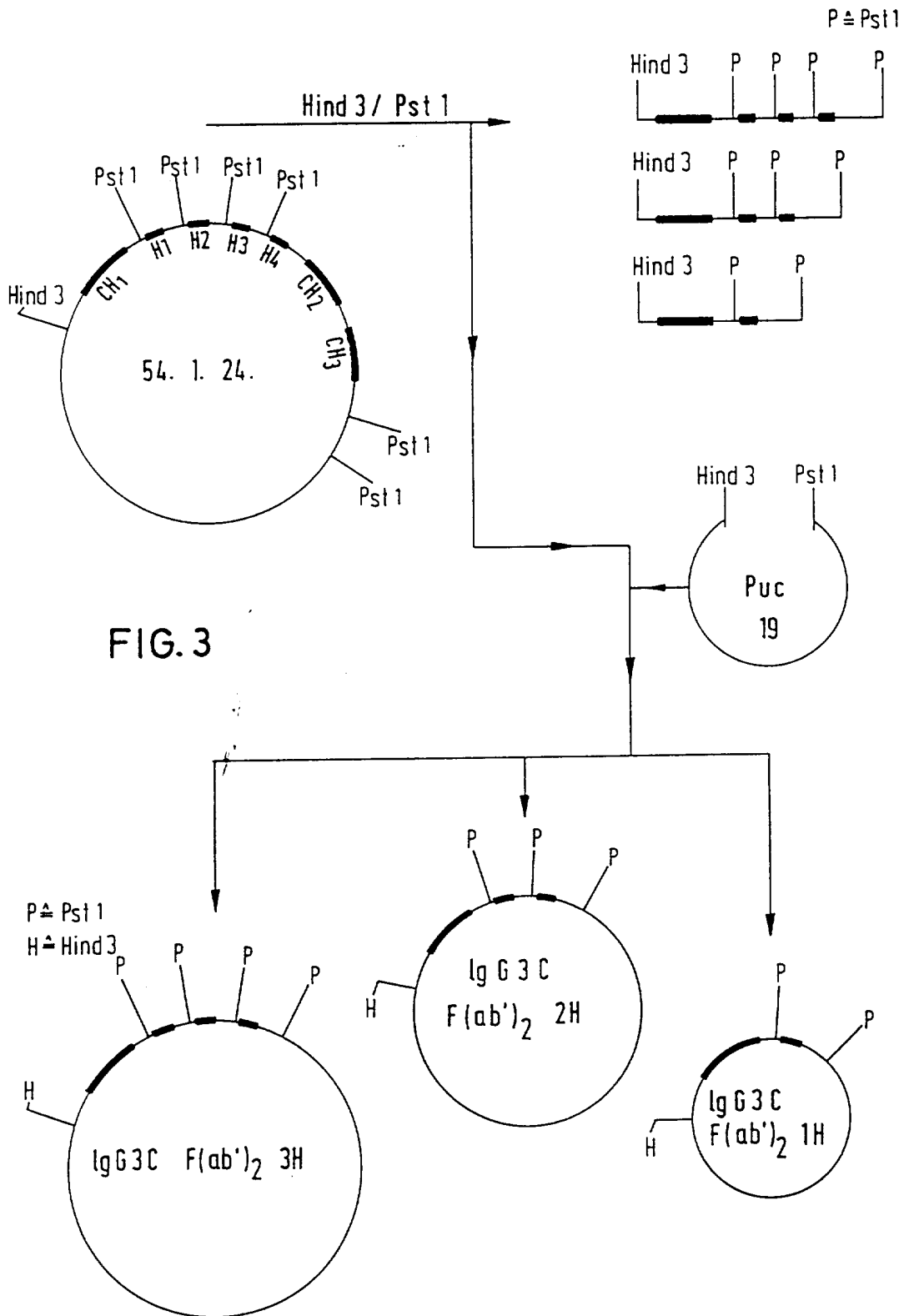
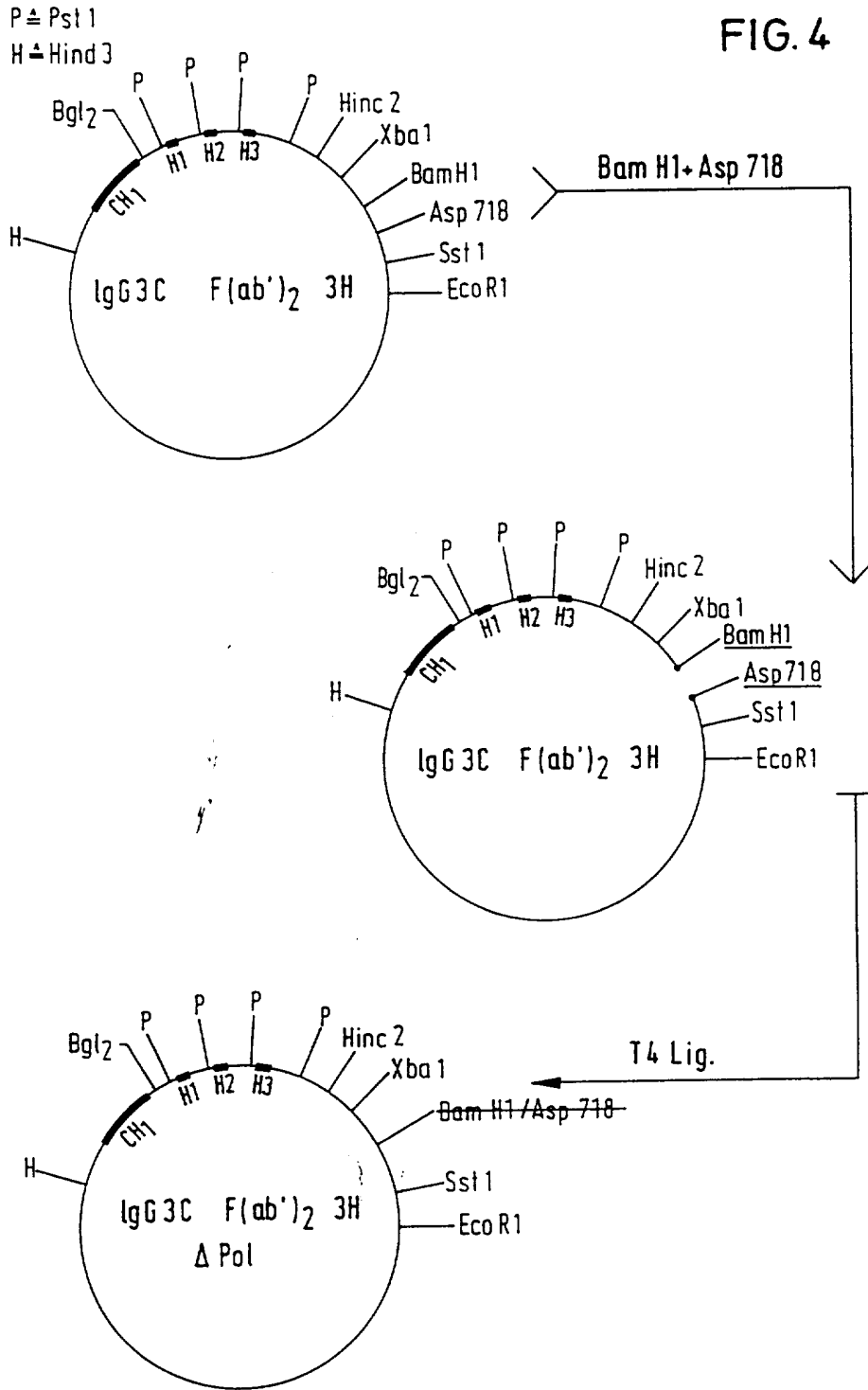


FIG. 4





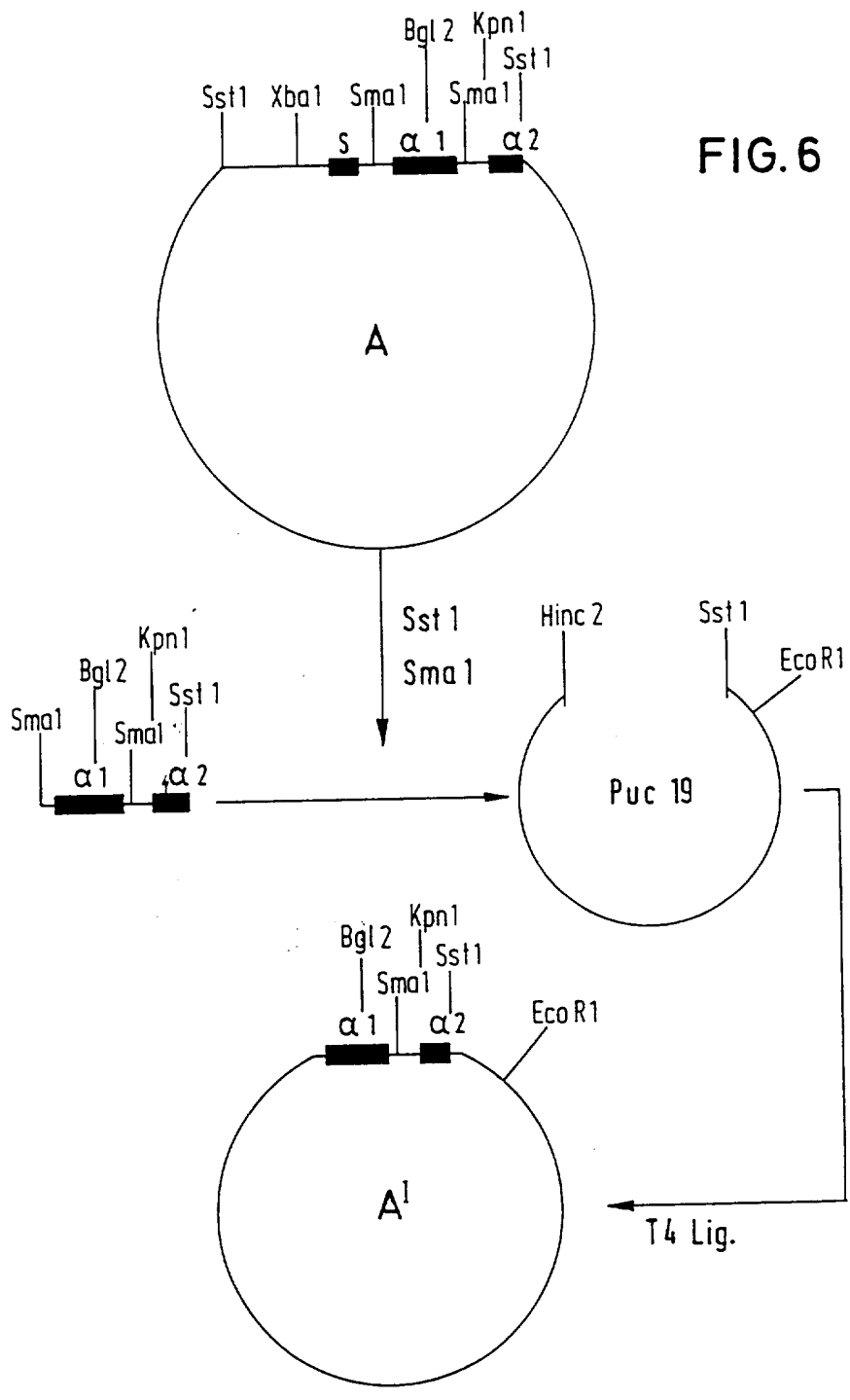


FIG. 6

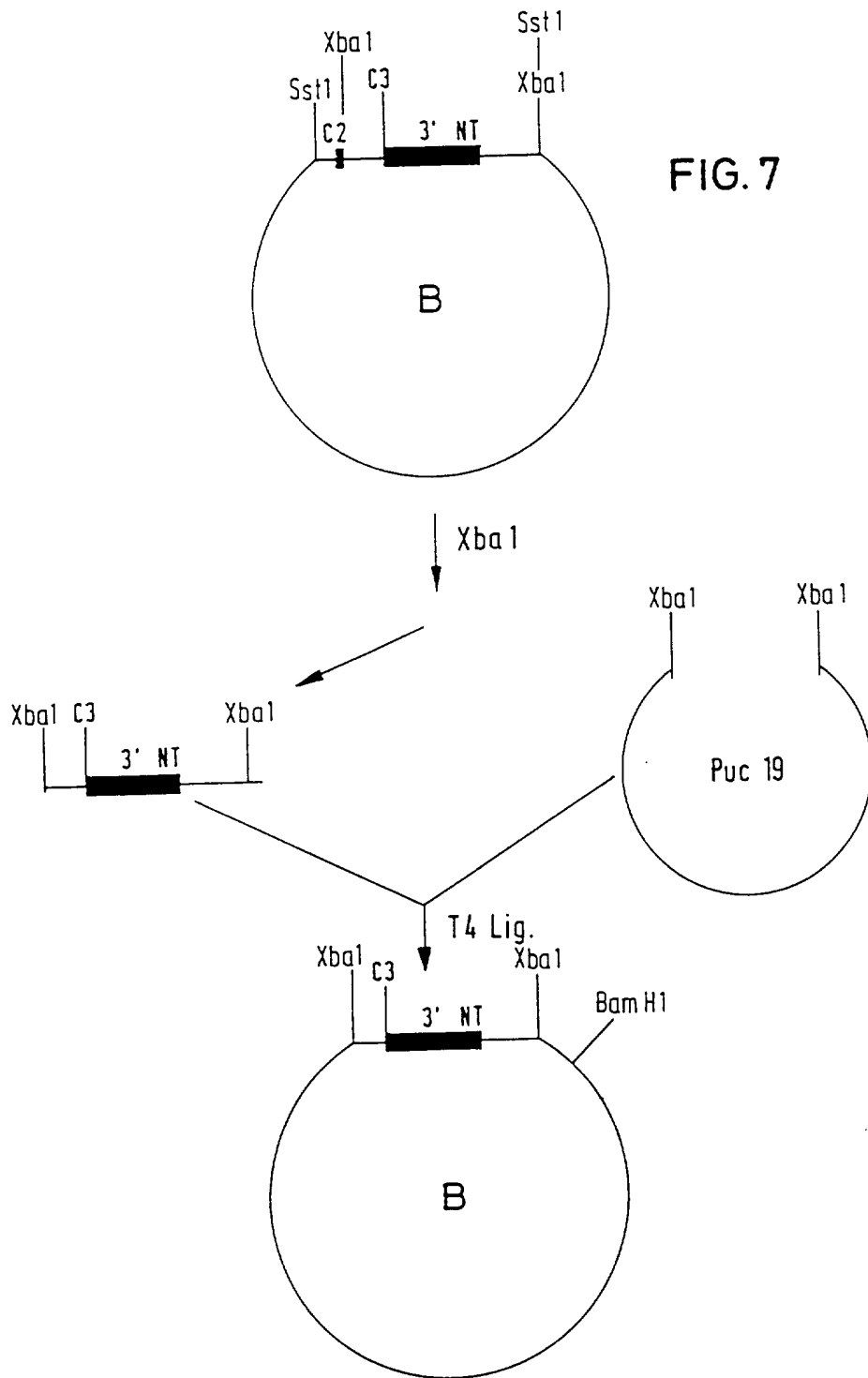
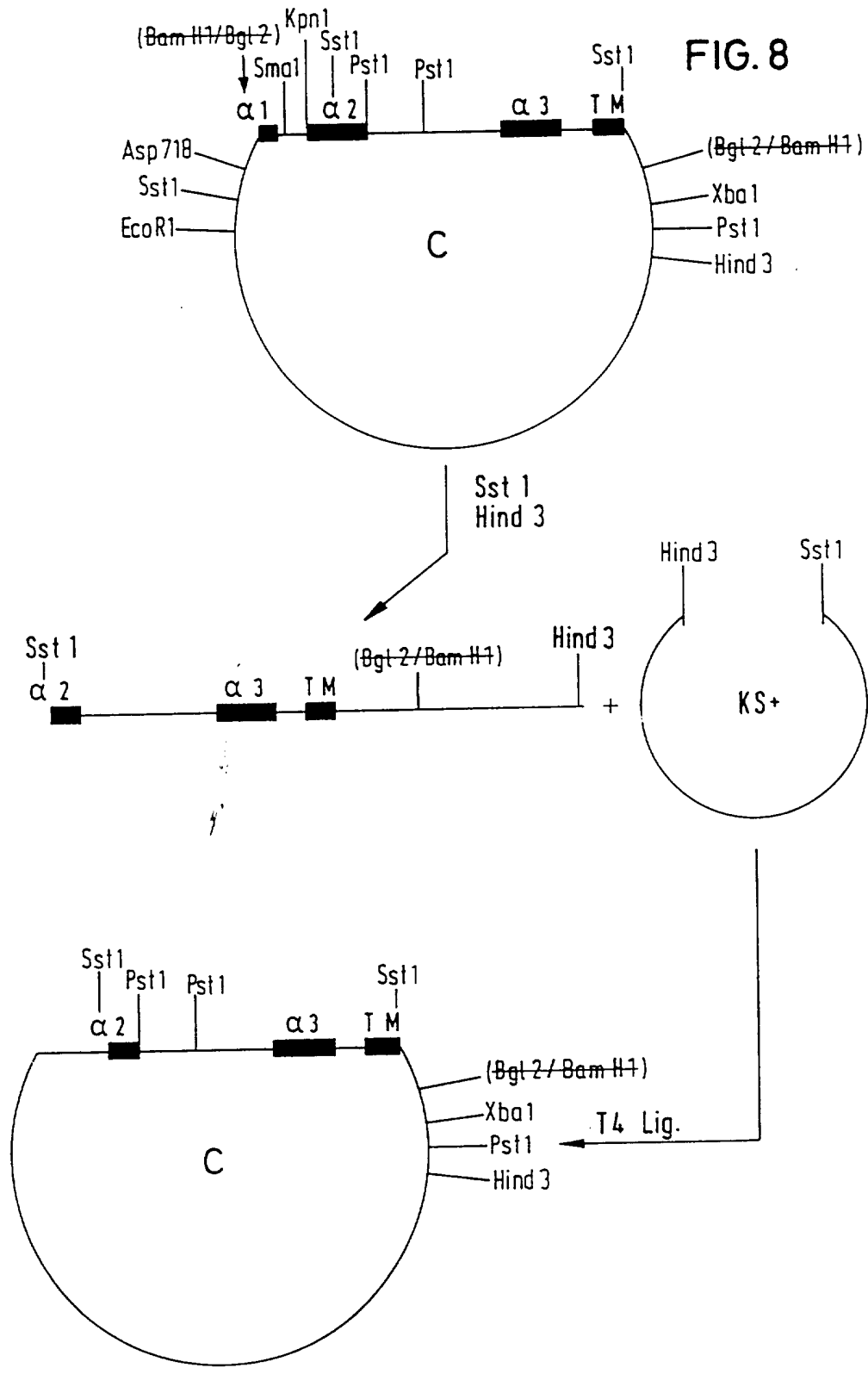


FIG. 7

FIG. 8



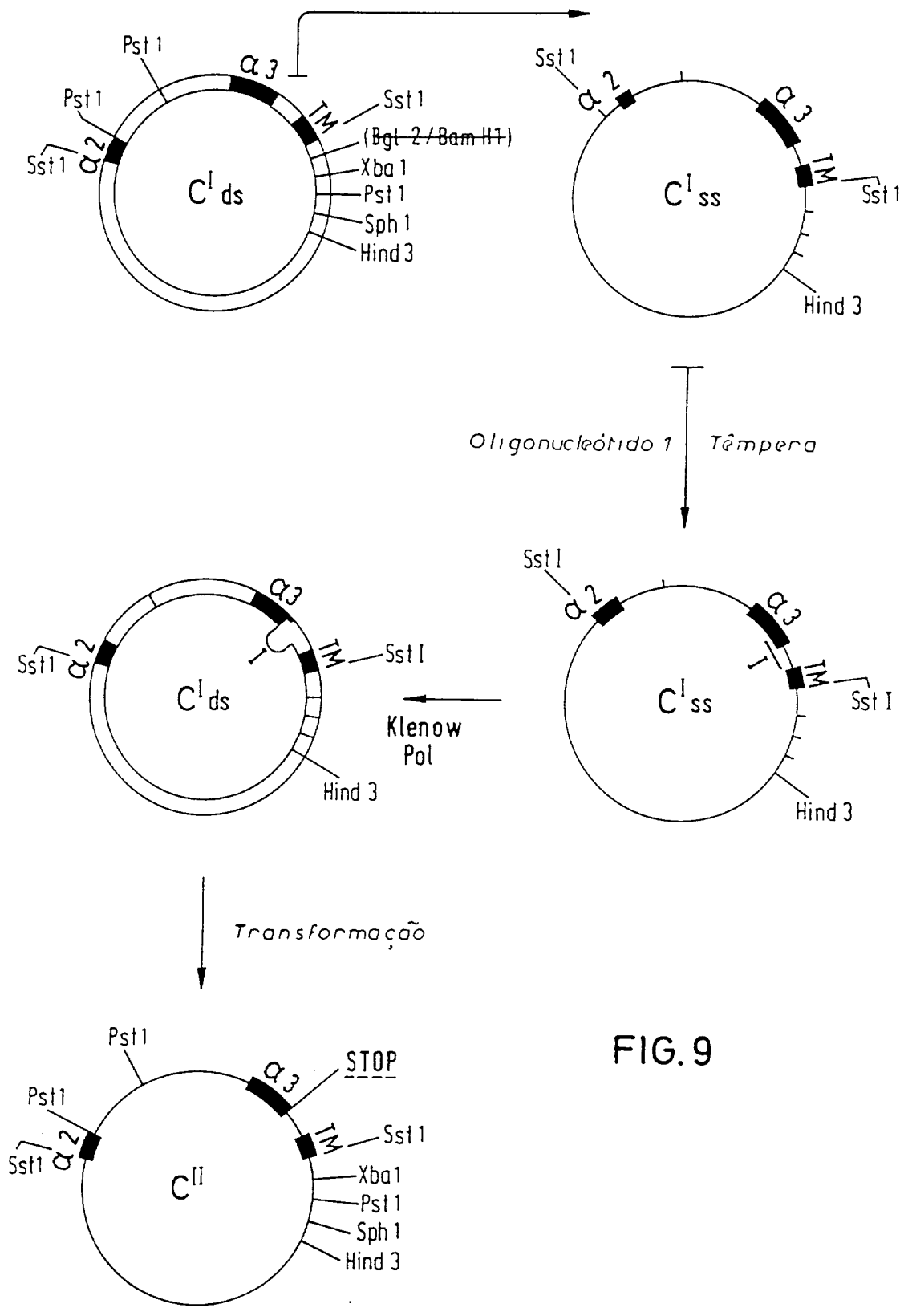


FIG. 9

FIG. 10

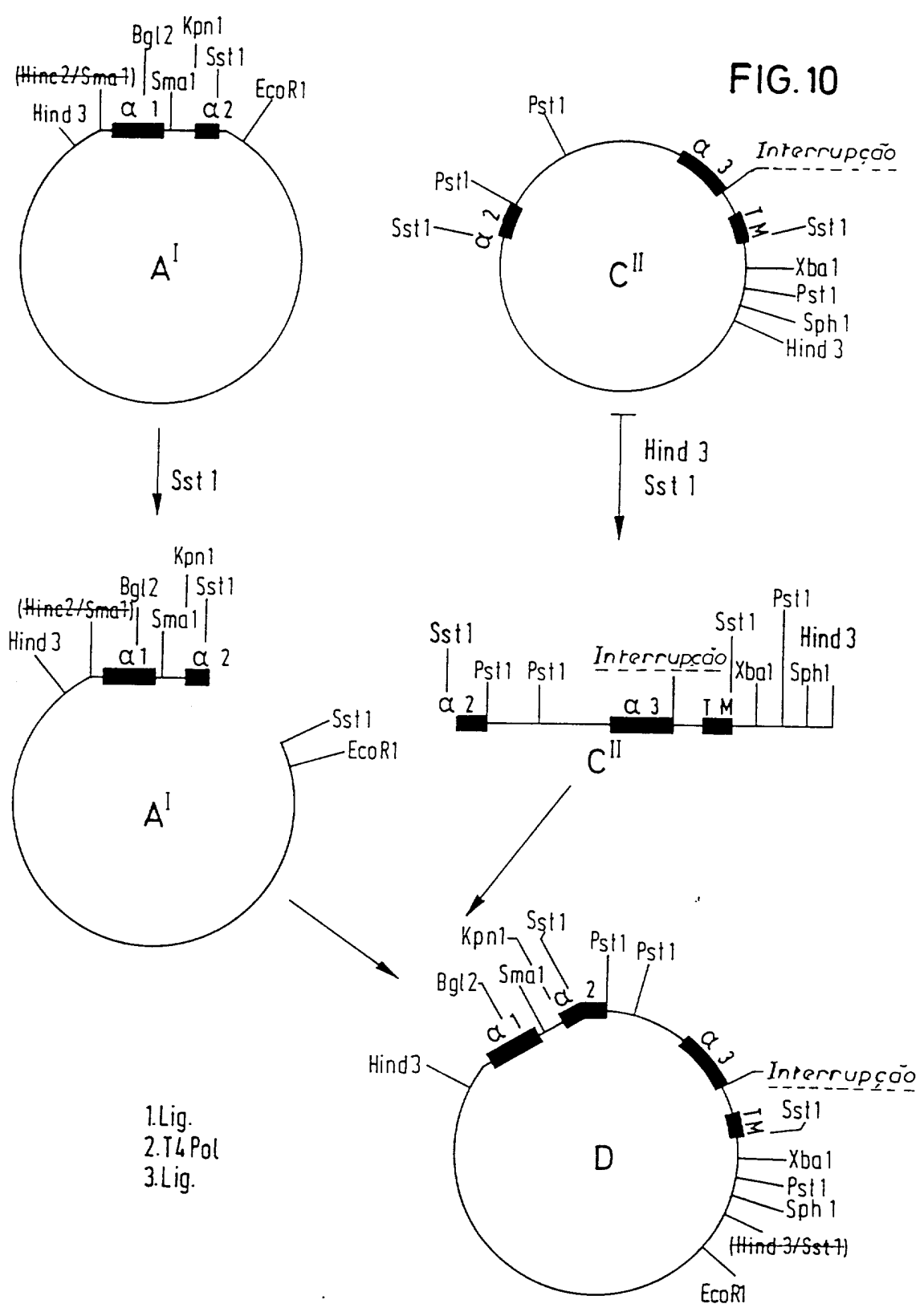
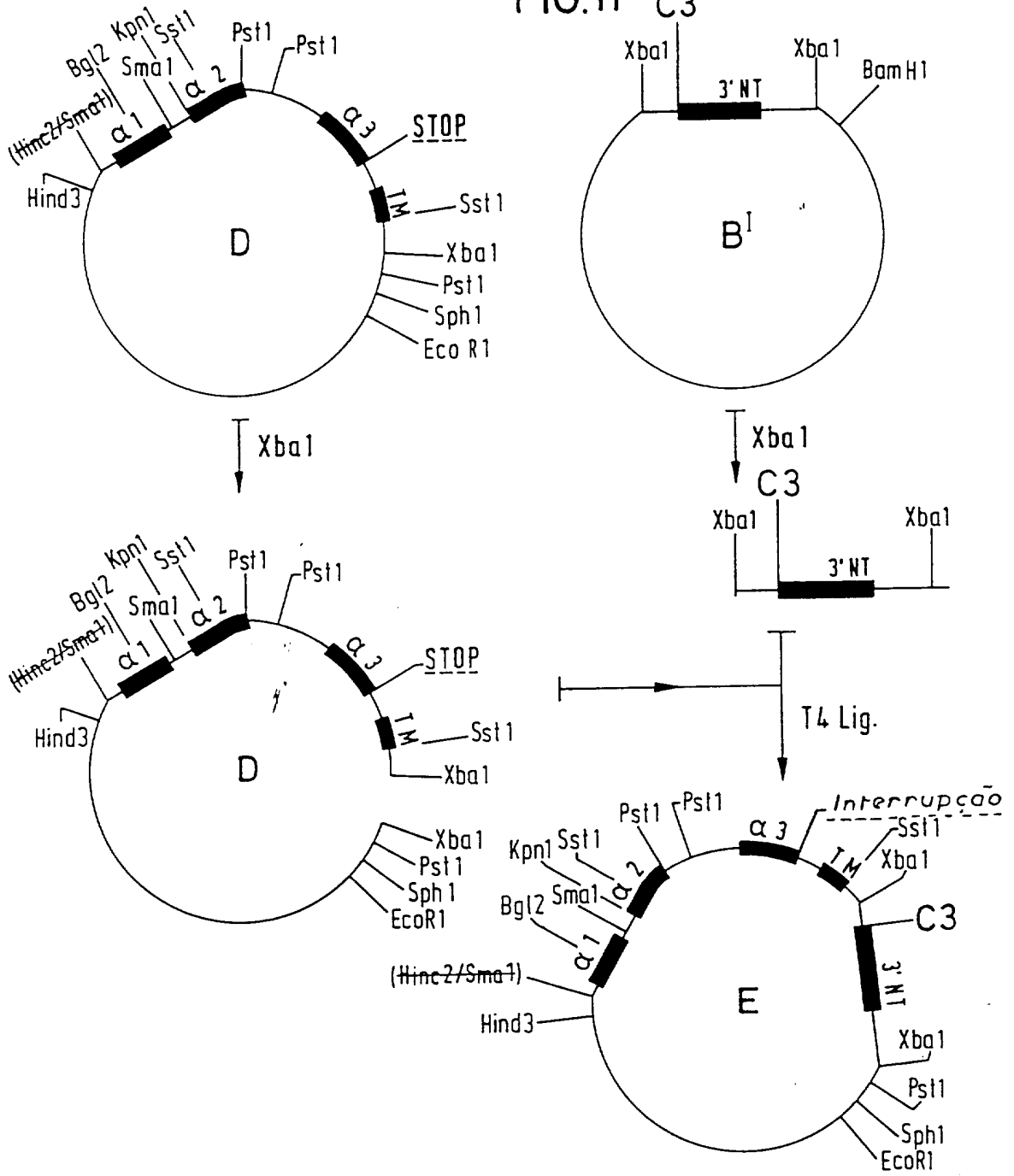


FIG.11 C3



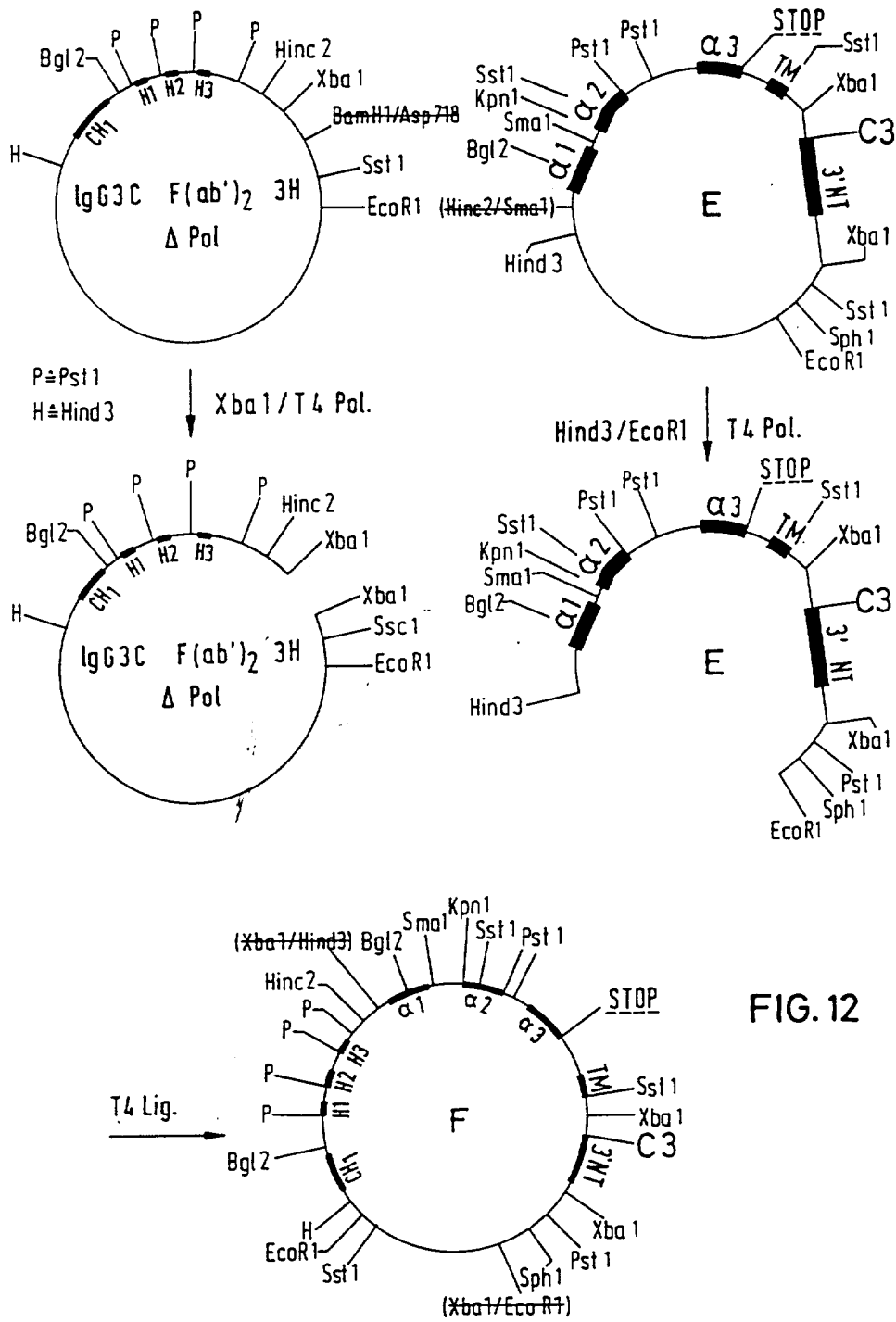


FIG. 12

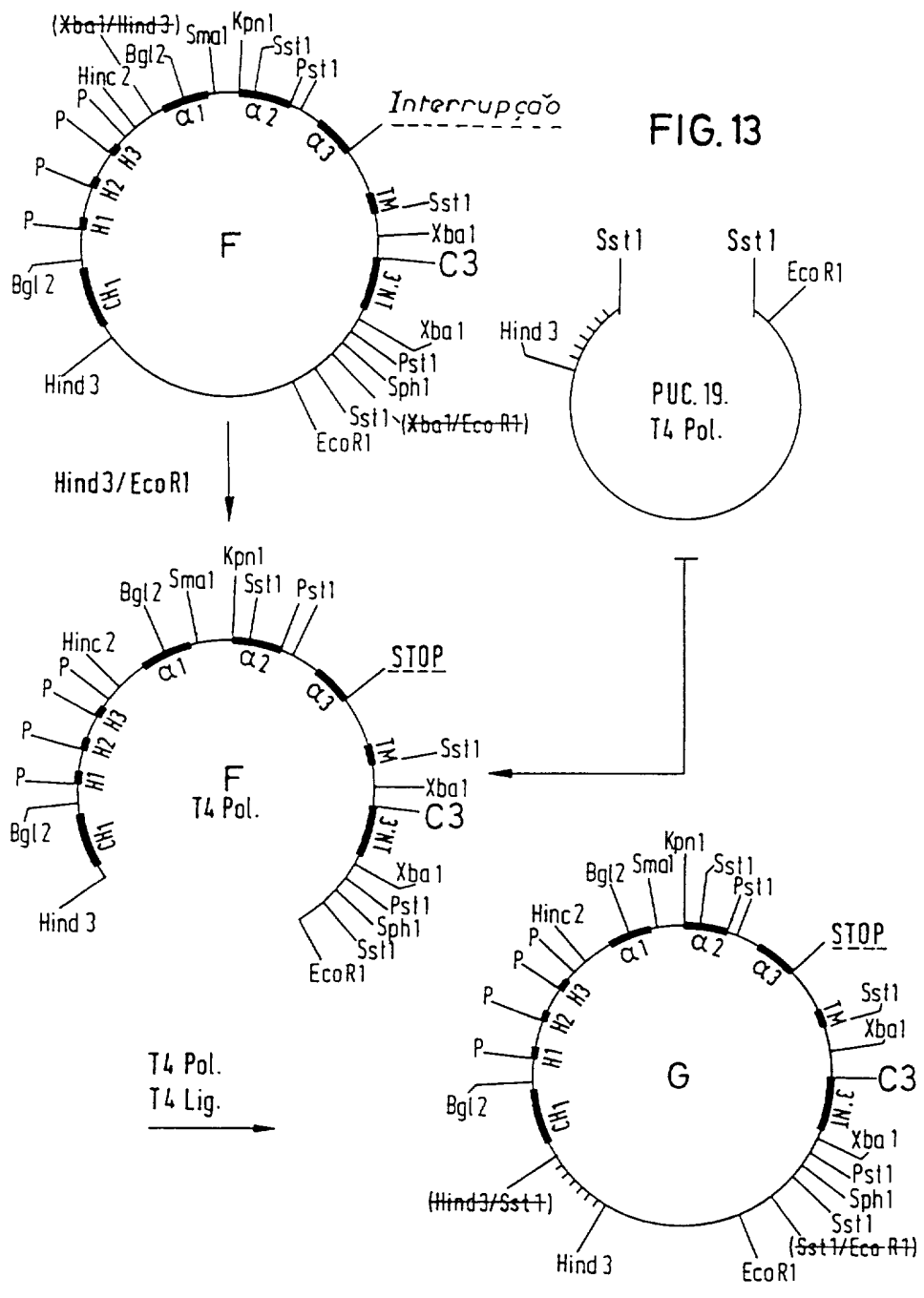
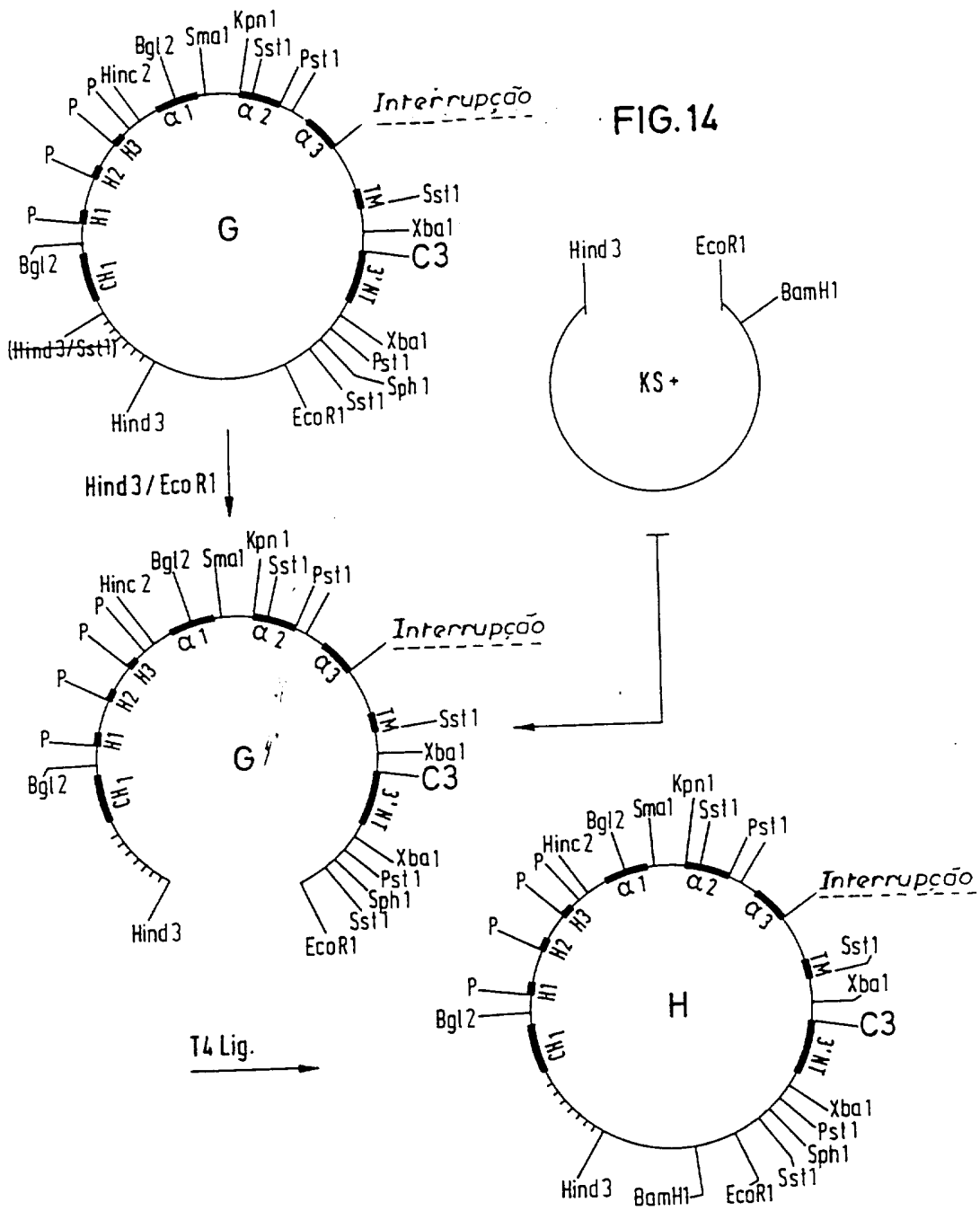


FIG. 13



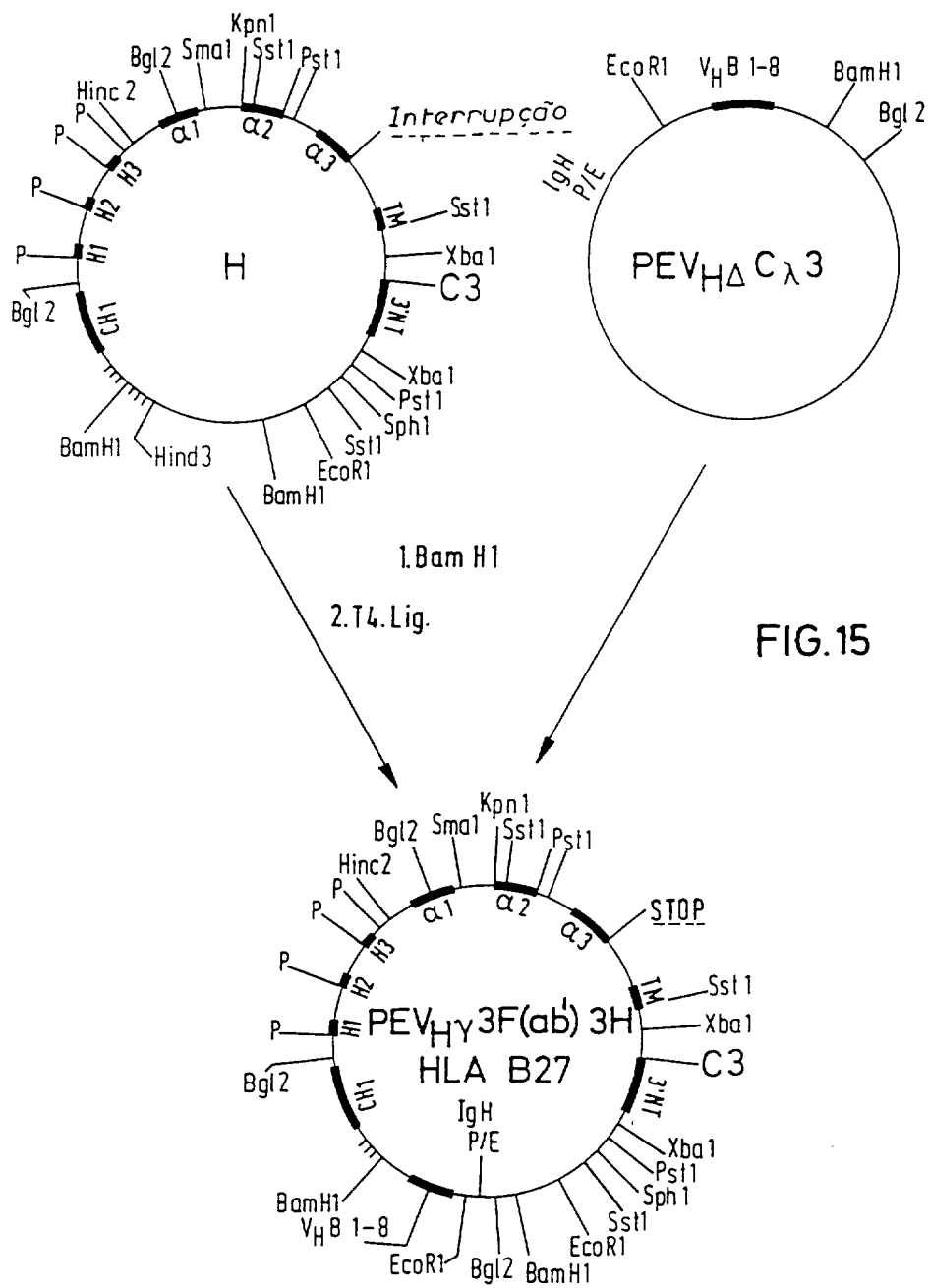


FIG. 15

FIG.16

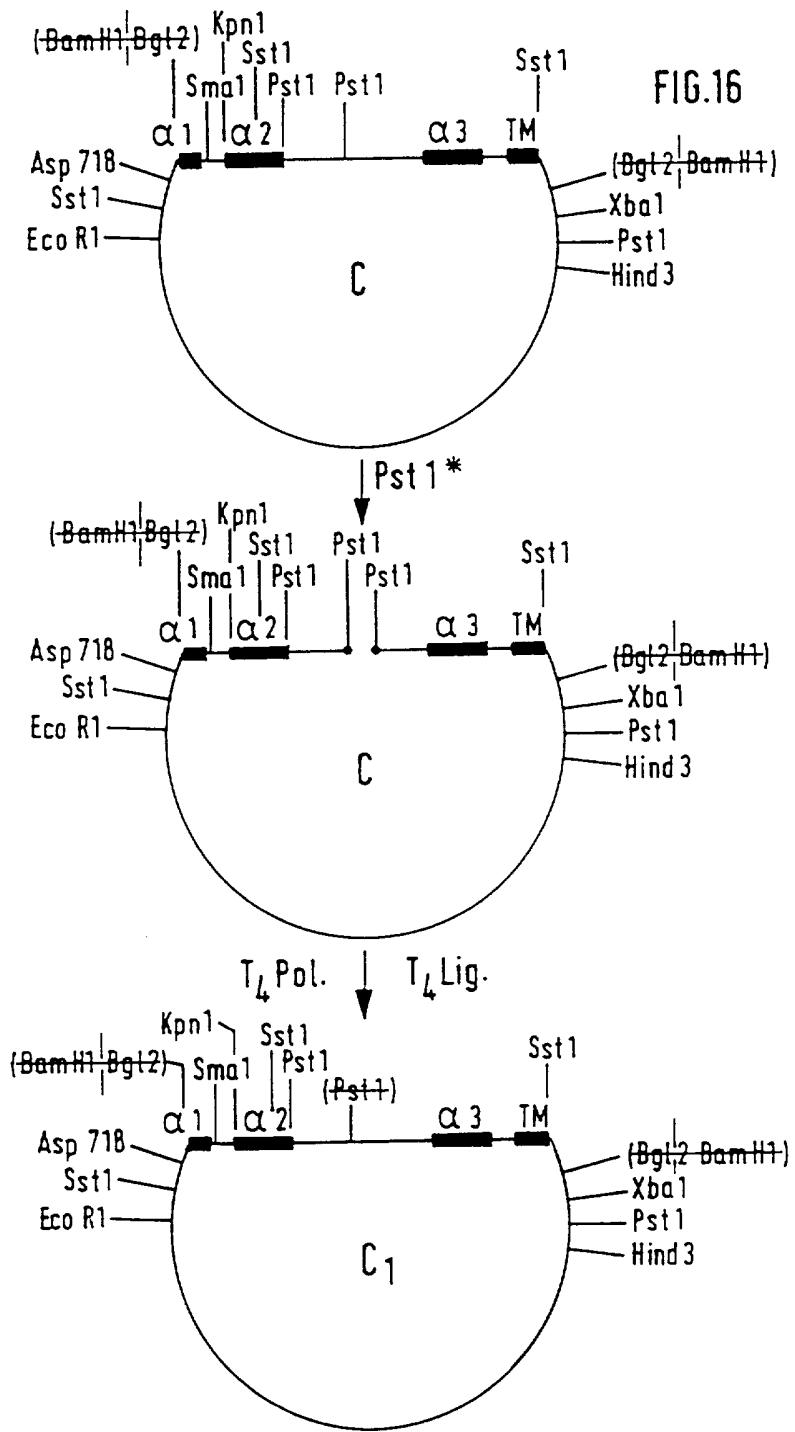


FIG. 17

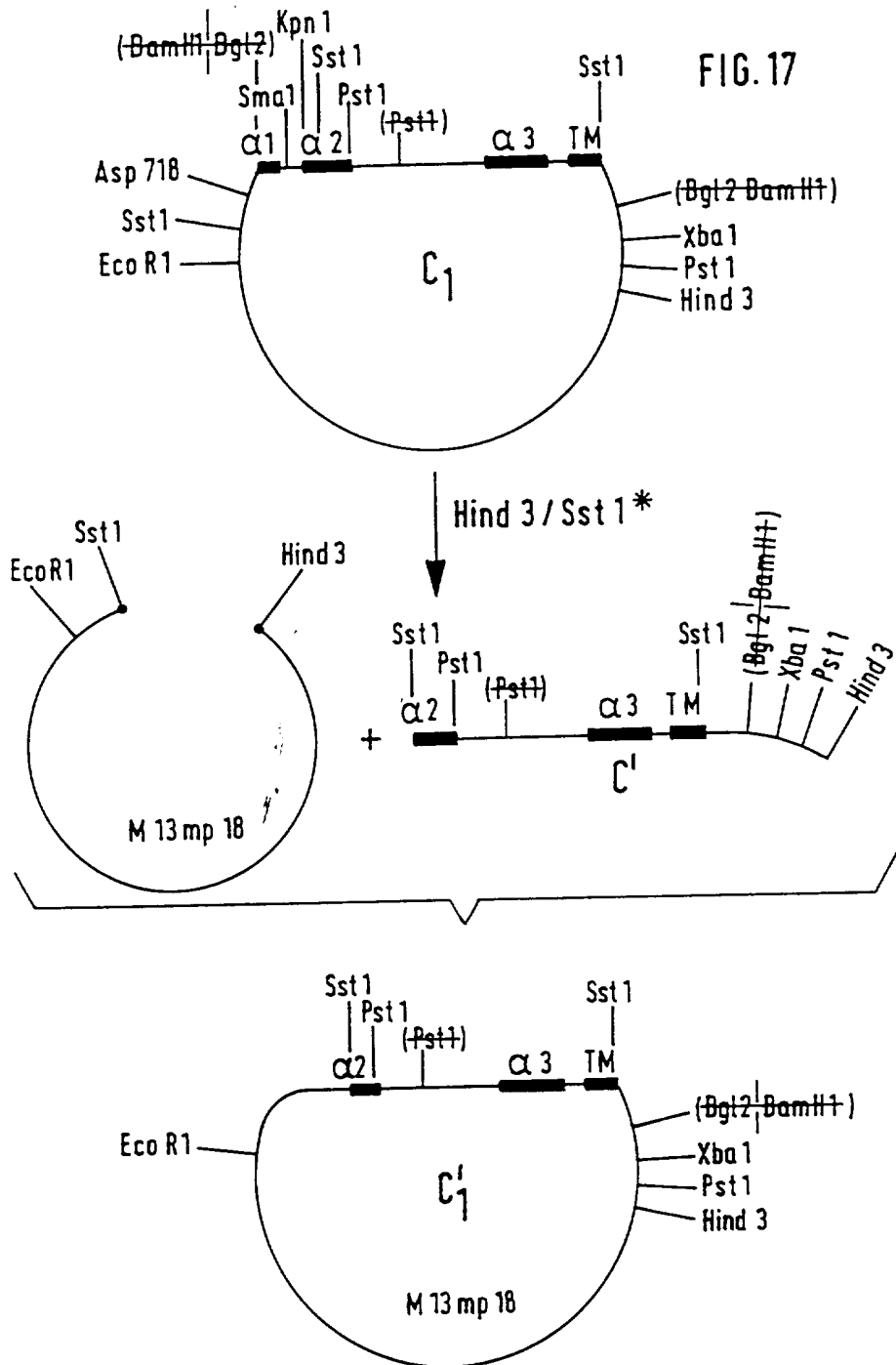


FIG. 17

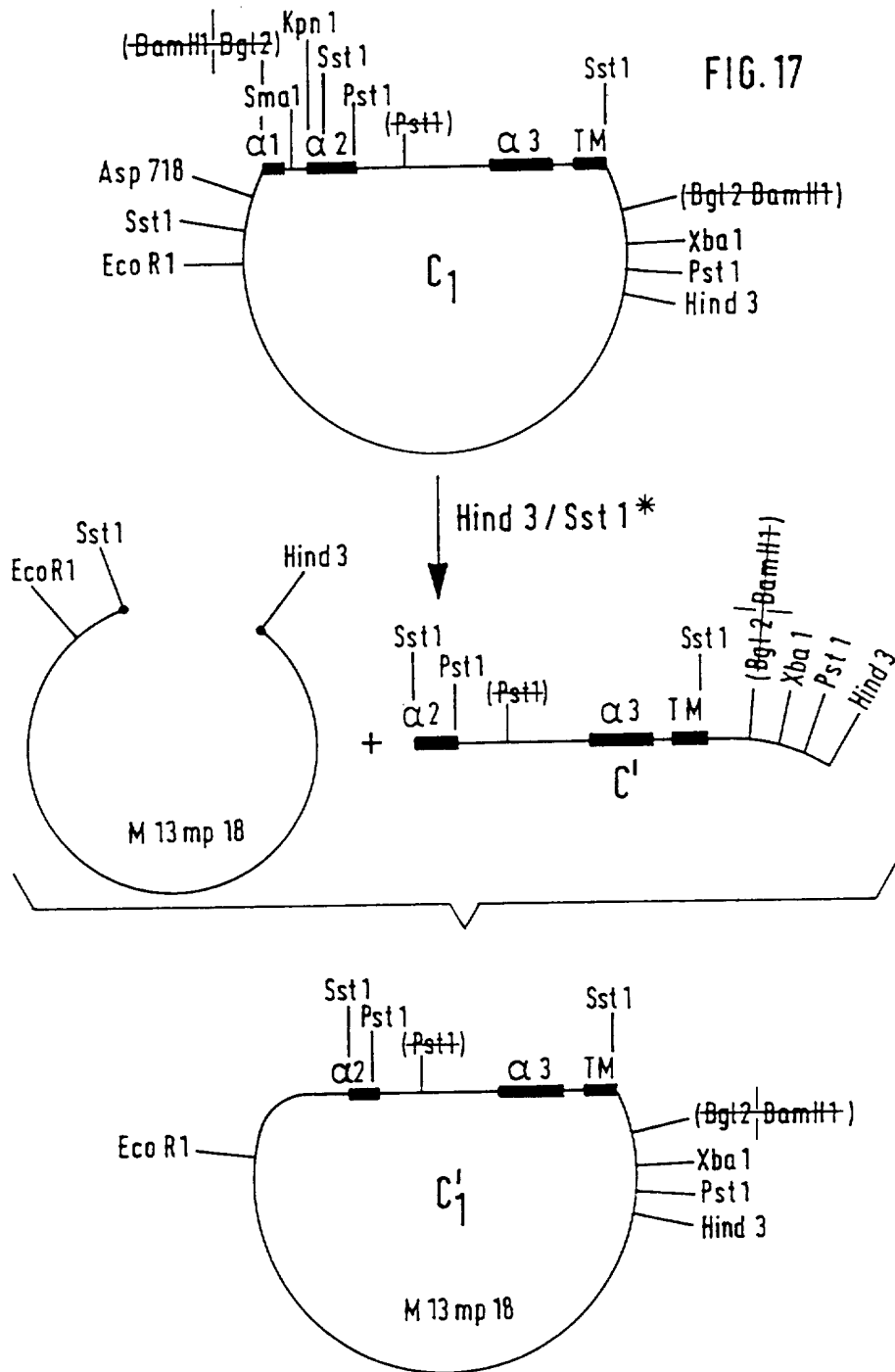


FIG. 18

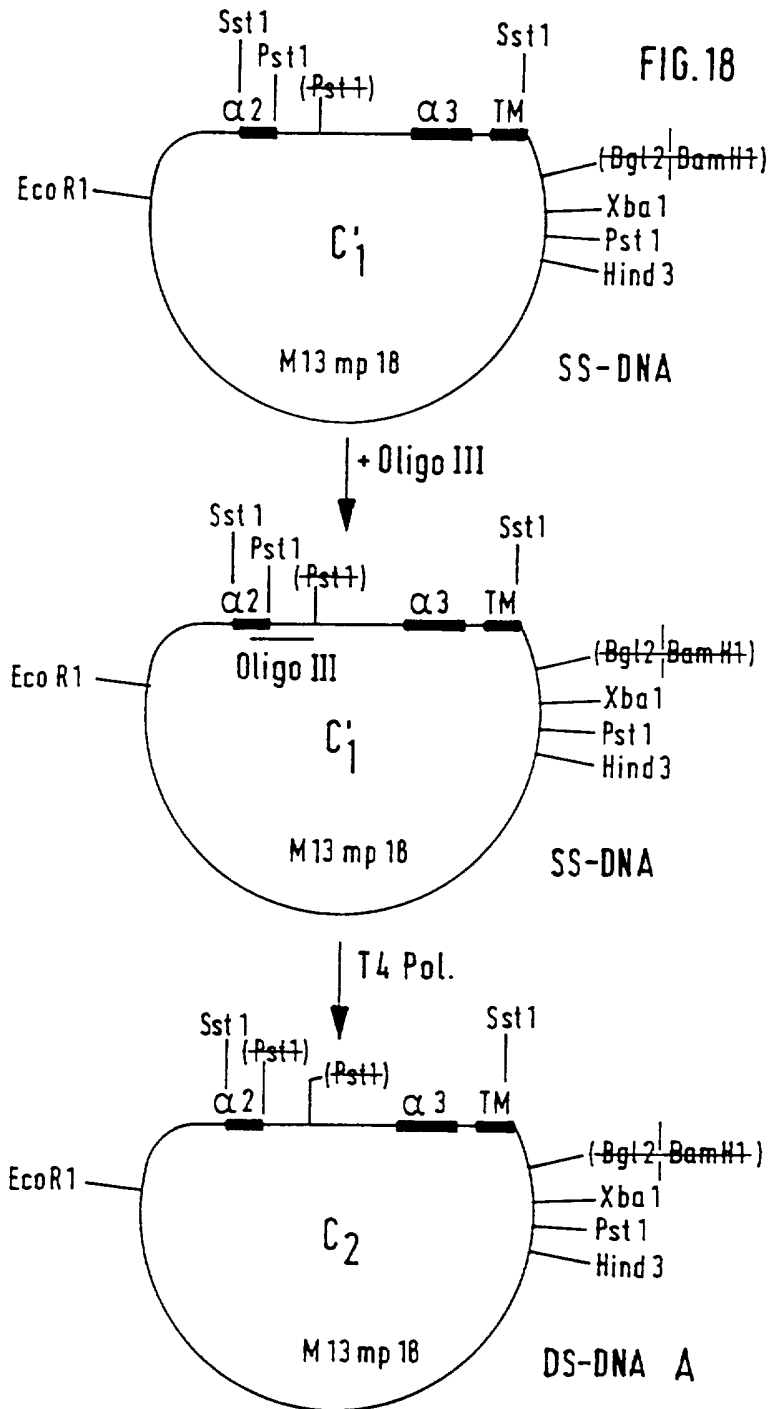
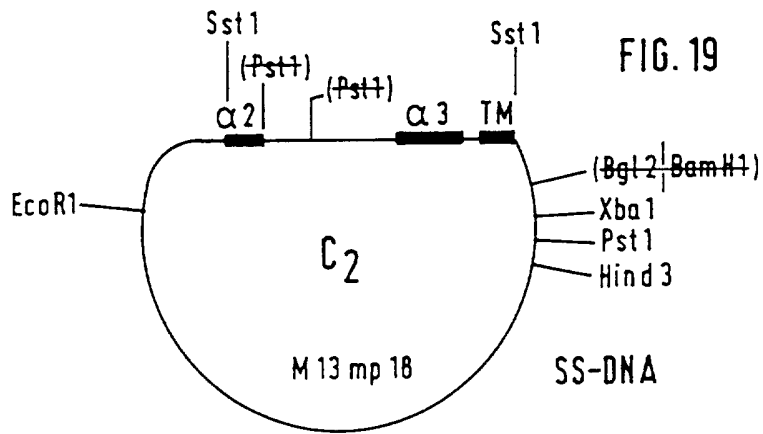


FIG. 19



+ Oligo IV

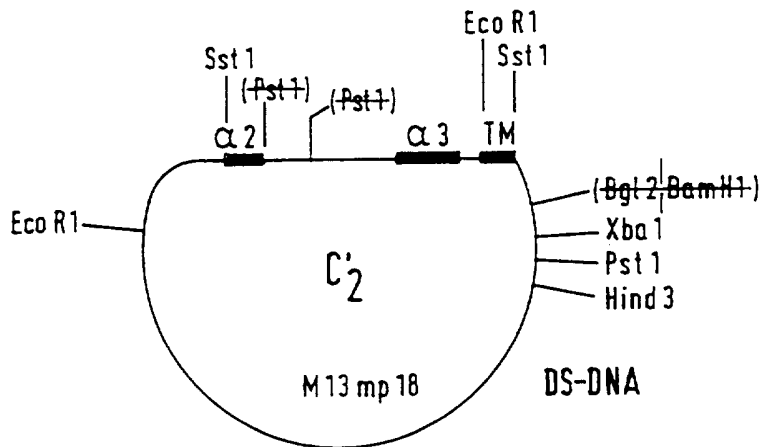
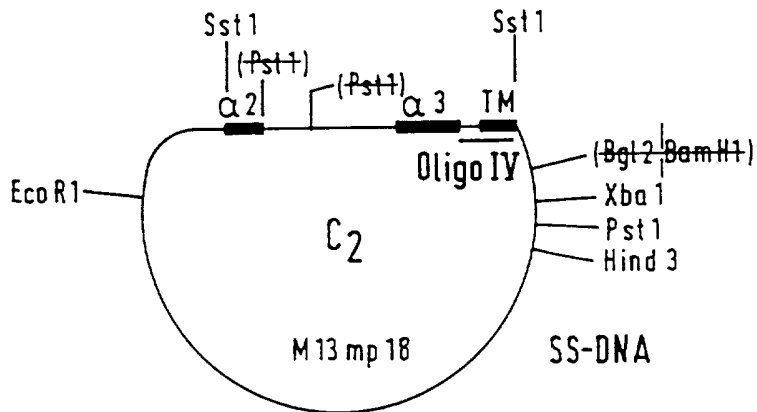


FIG. 20

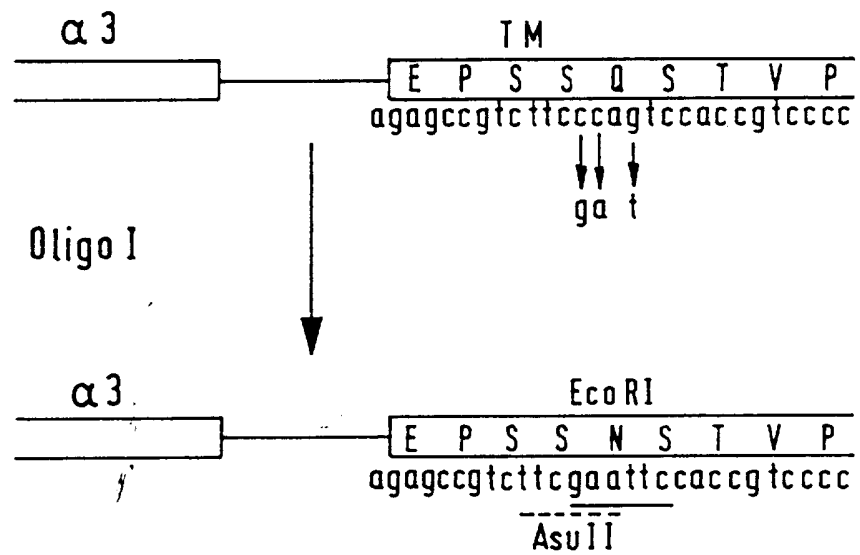


FIG. 21

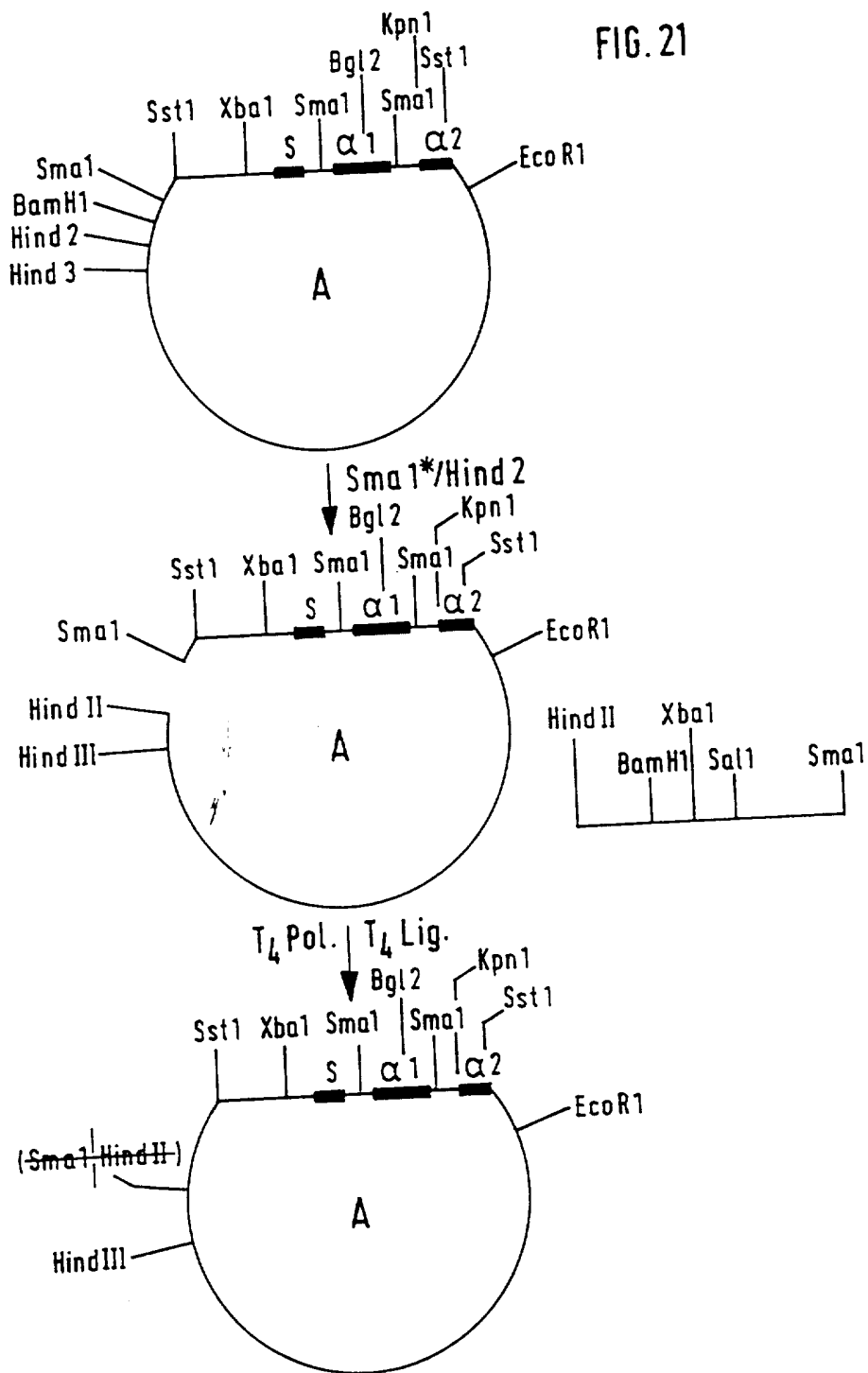
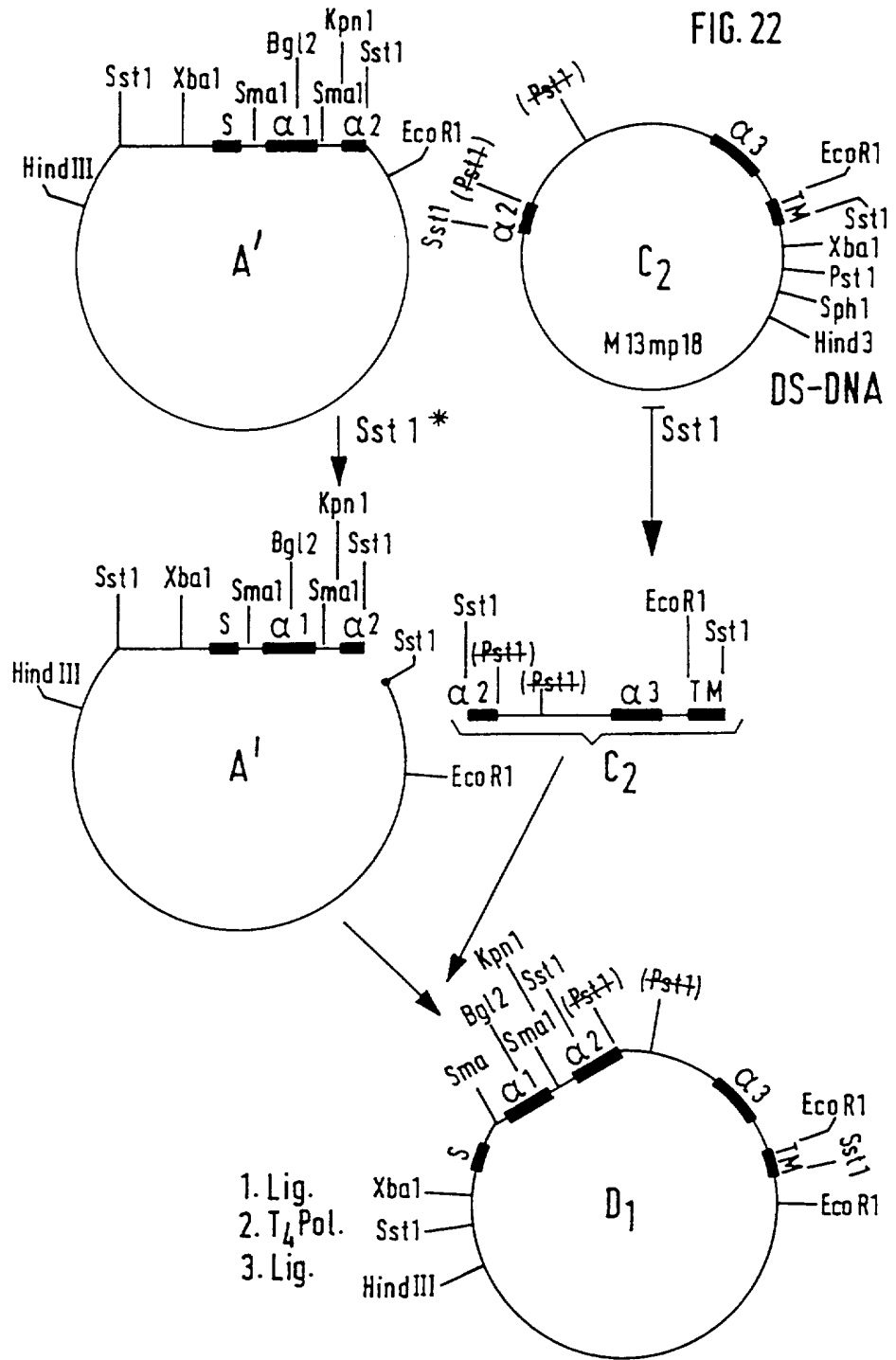


FIG. 22



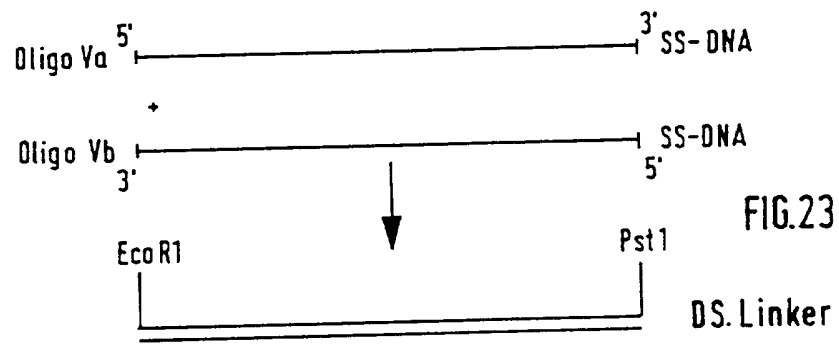


FIG.23

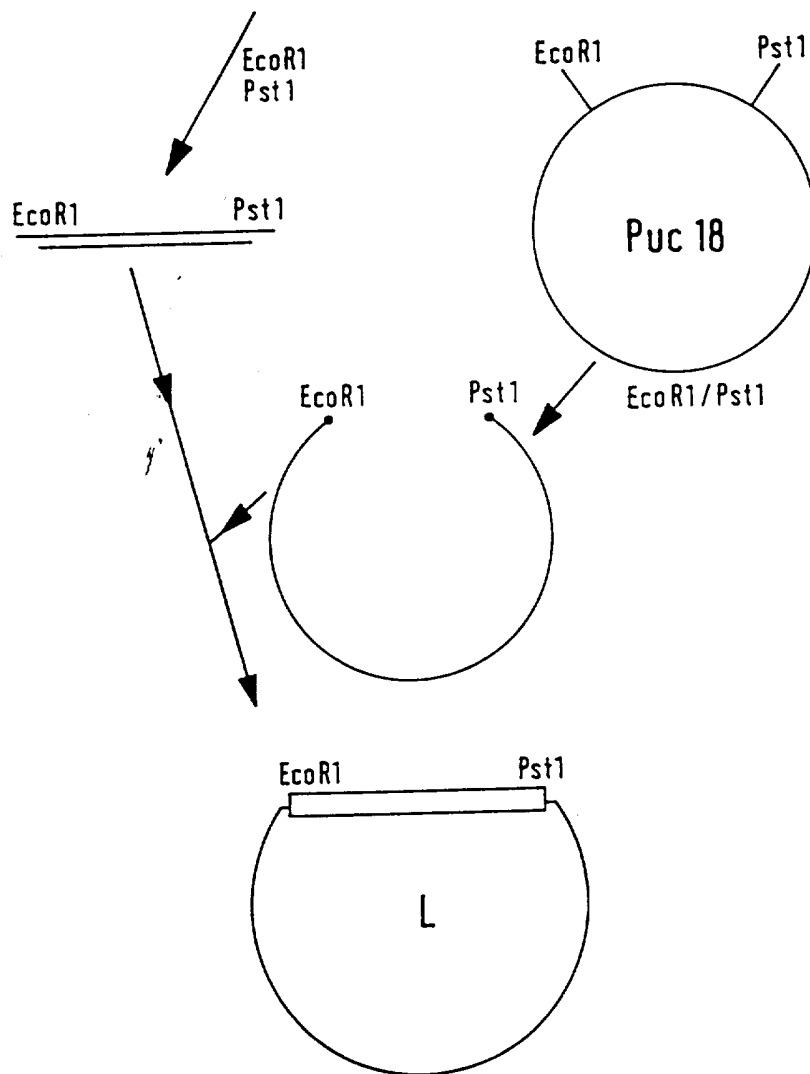


FIG. 24

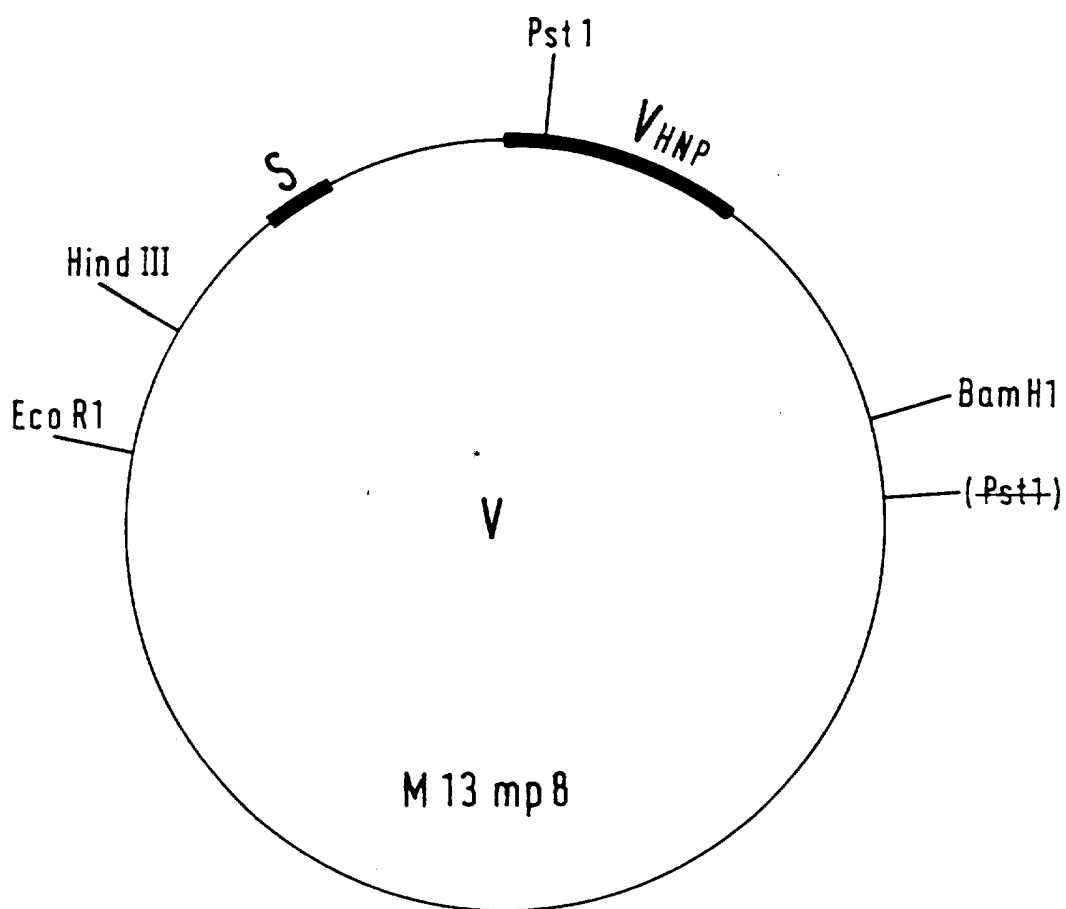


FIG. 25

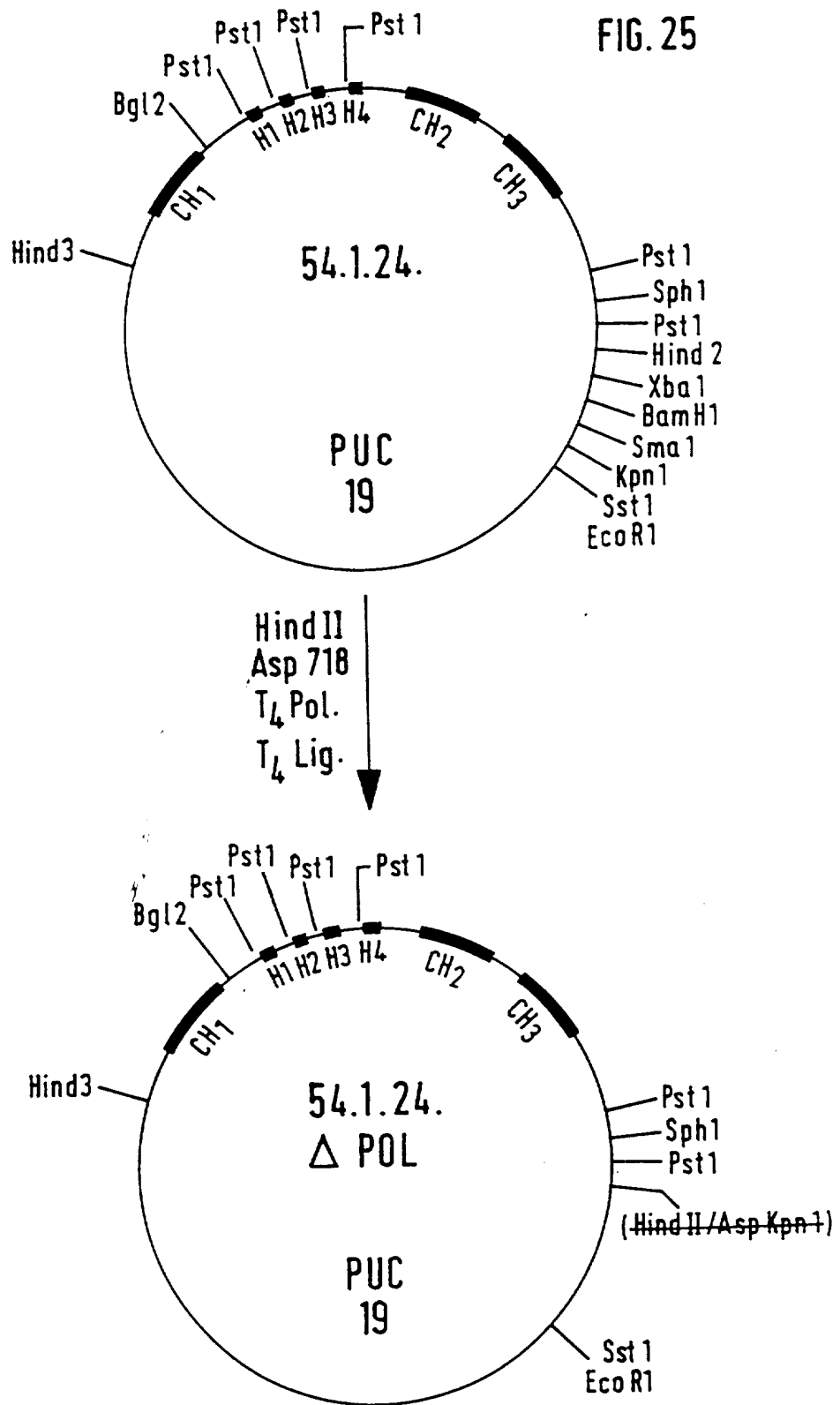
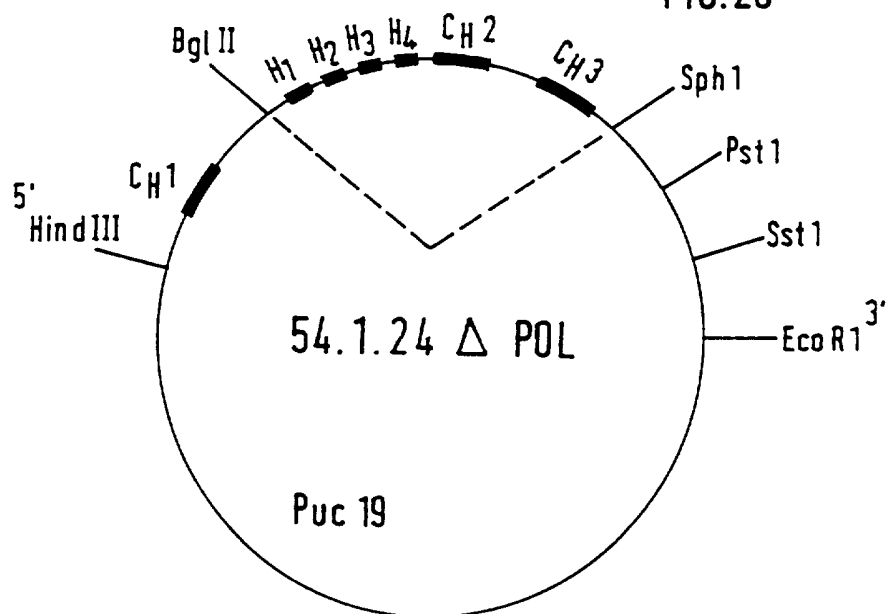


FIG. 26



Bgl II | Sph I  
T<sub>4</sub> Pol. | T<sub>4</sub> Lig.

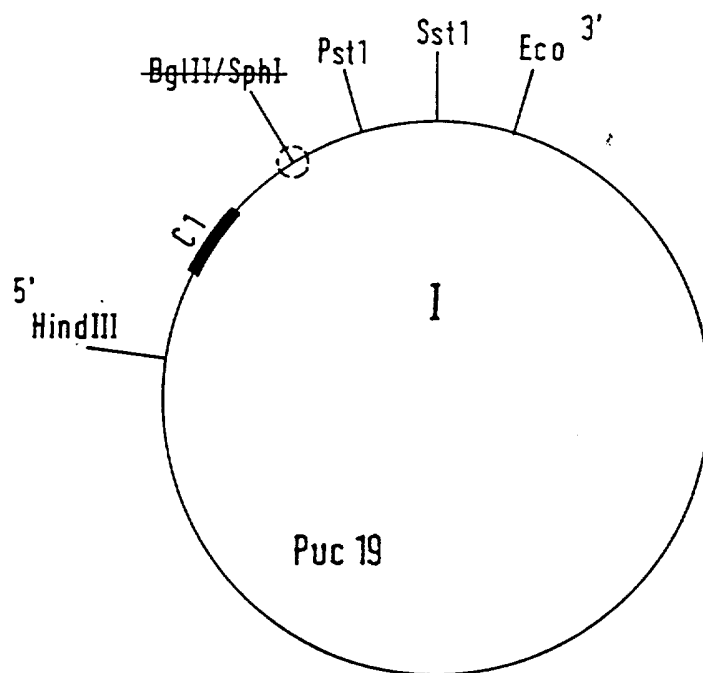


FIG. 27

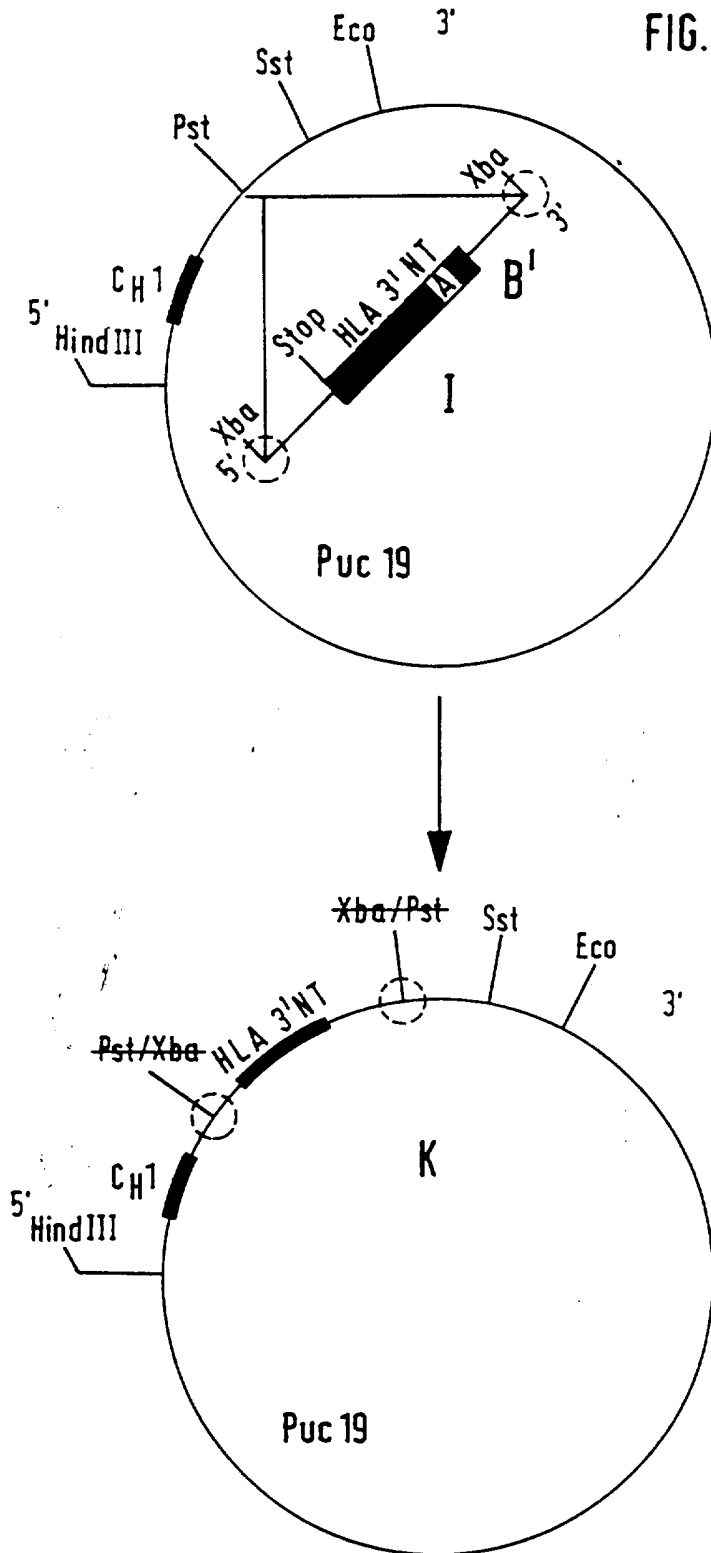


FIG. 28

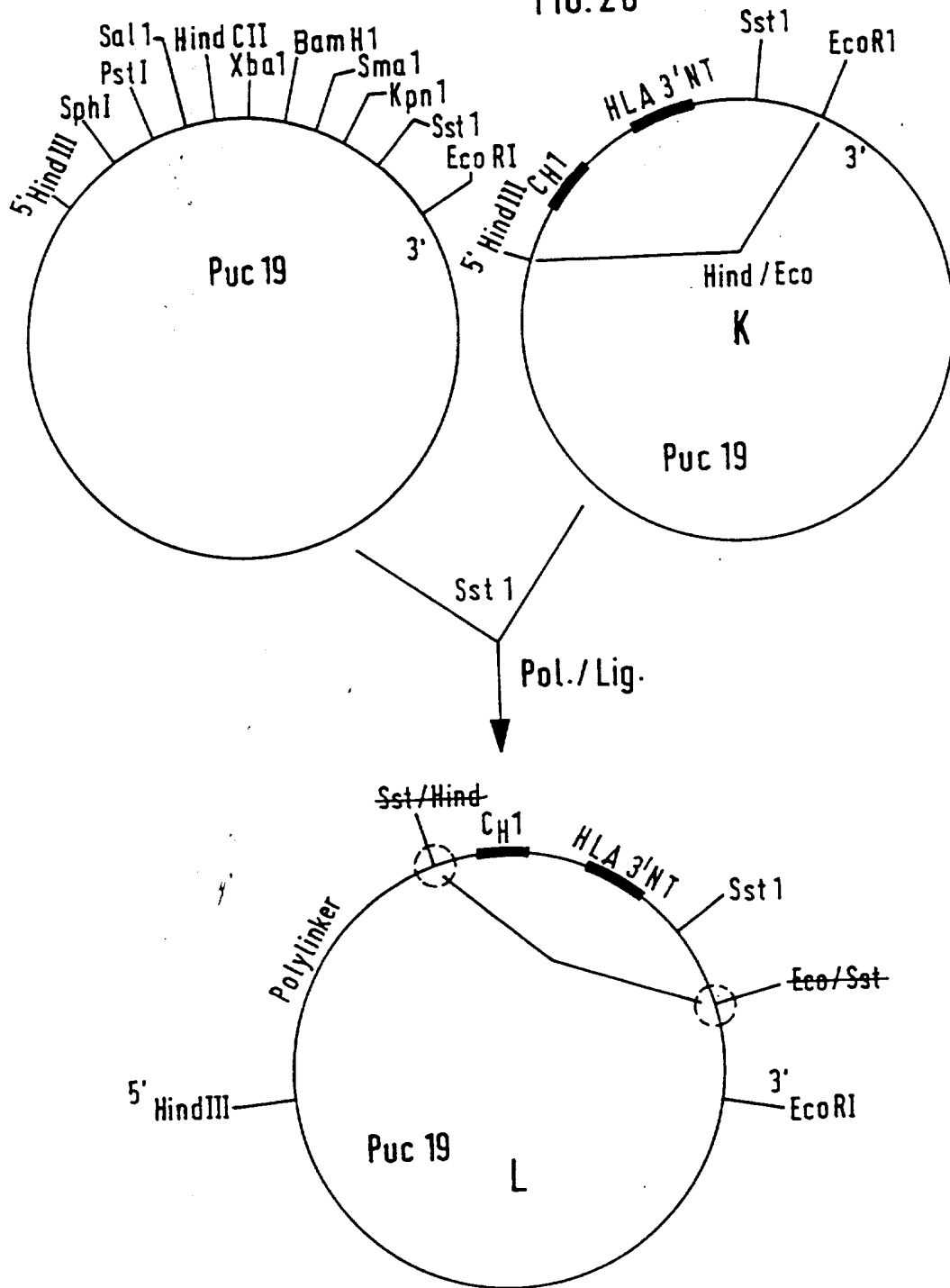


FIG. 29

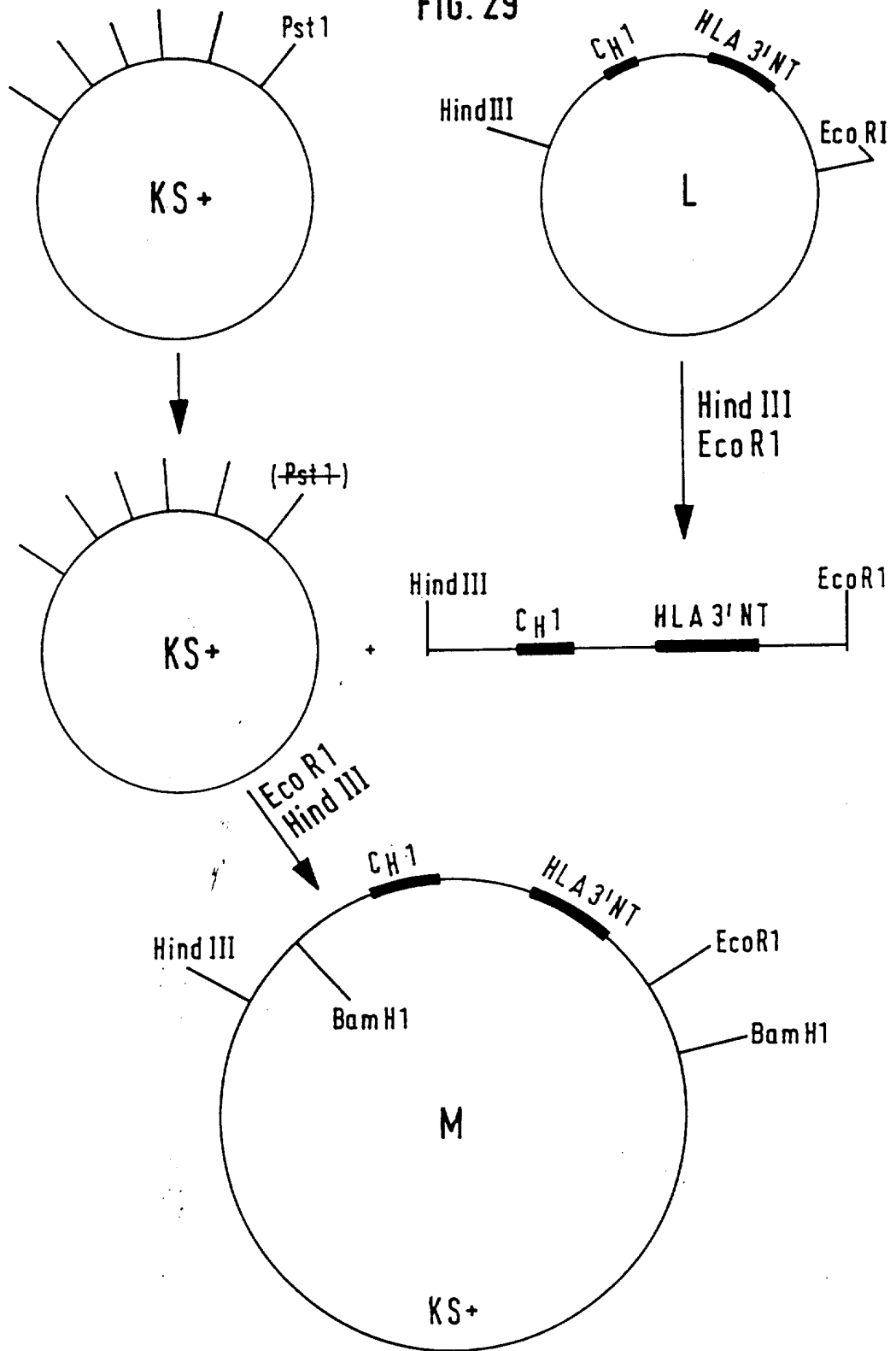
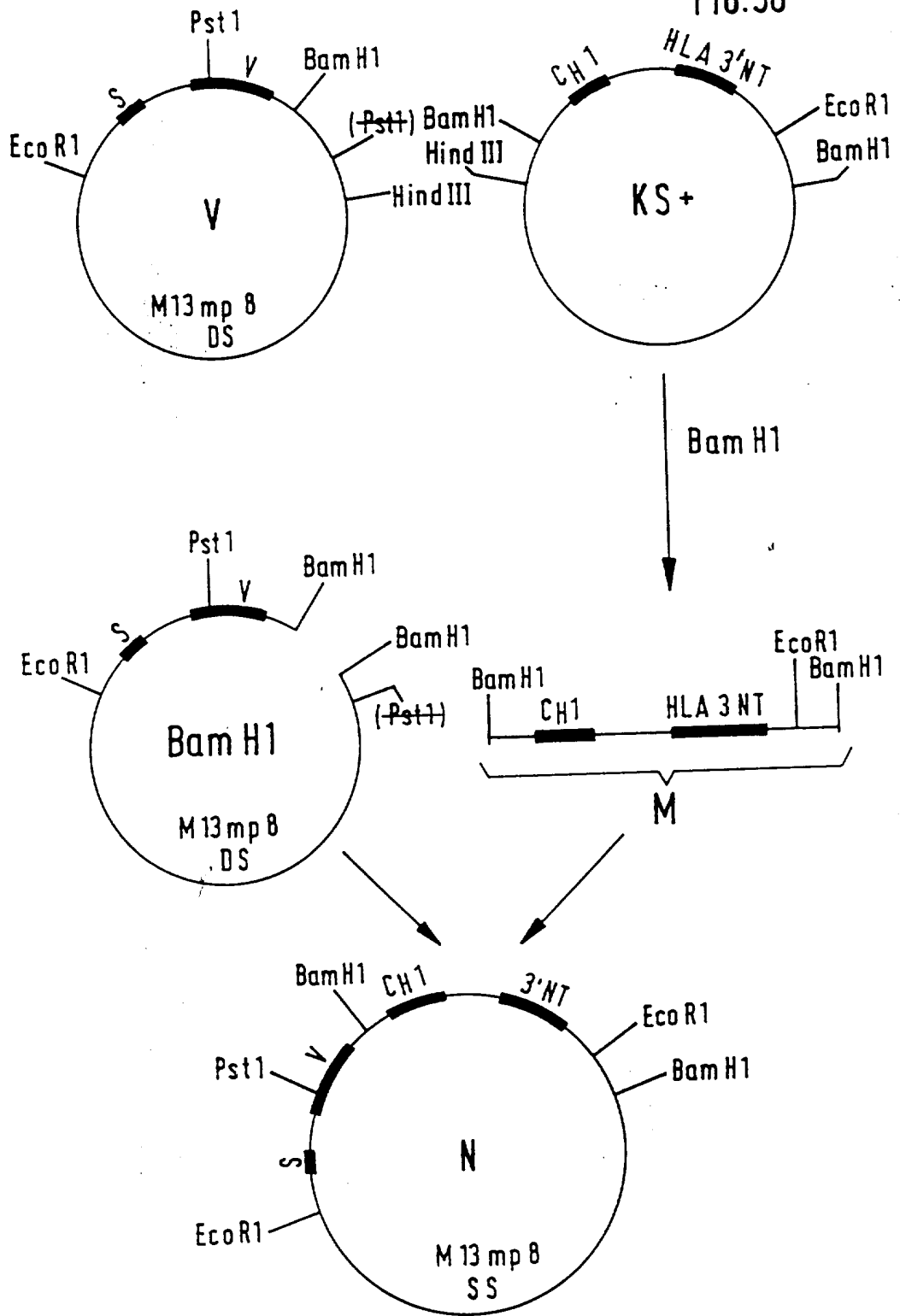


FIG. 30



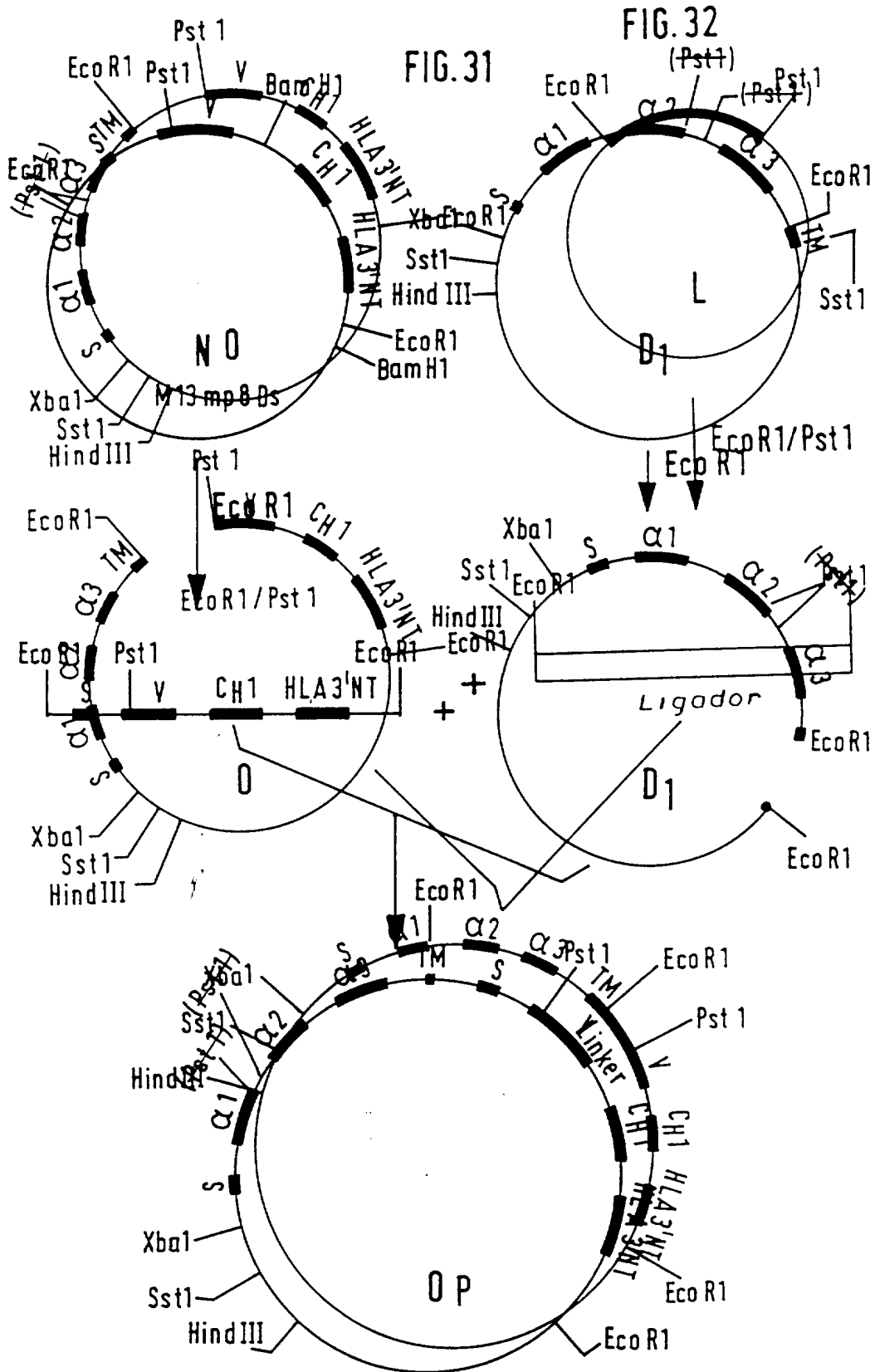
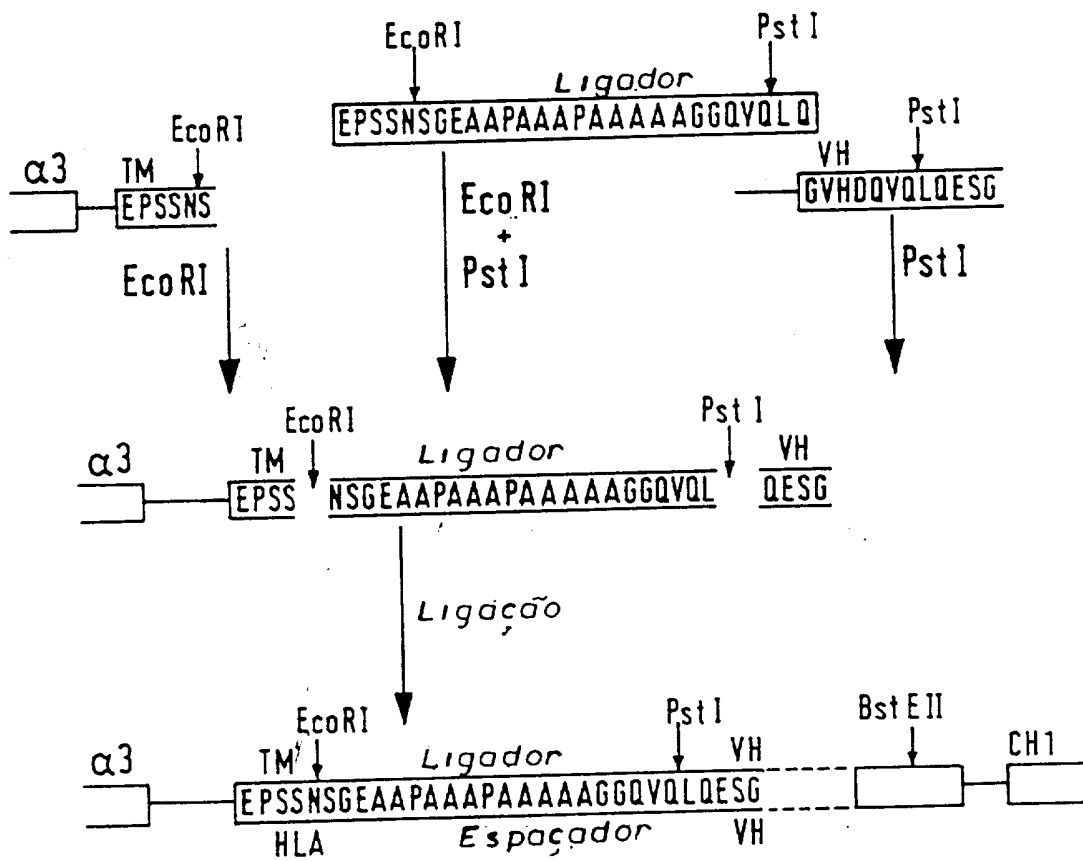


FIG. 33



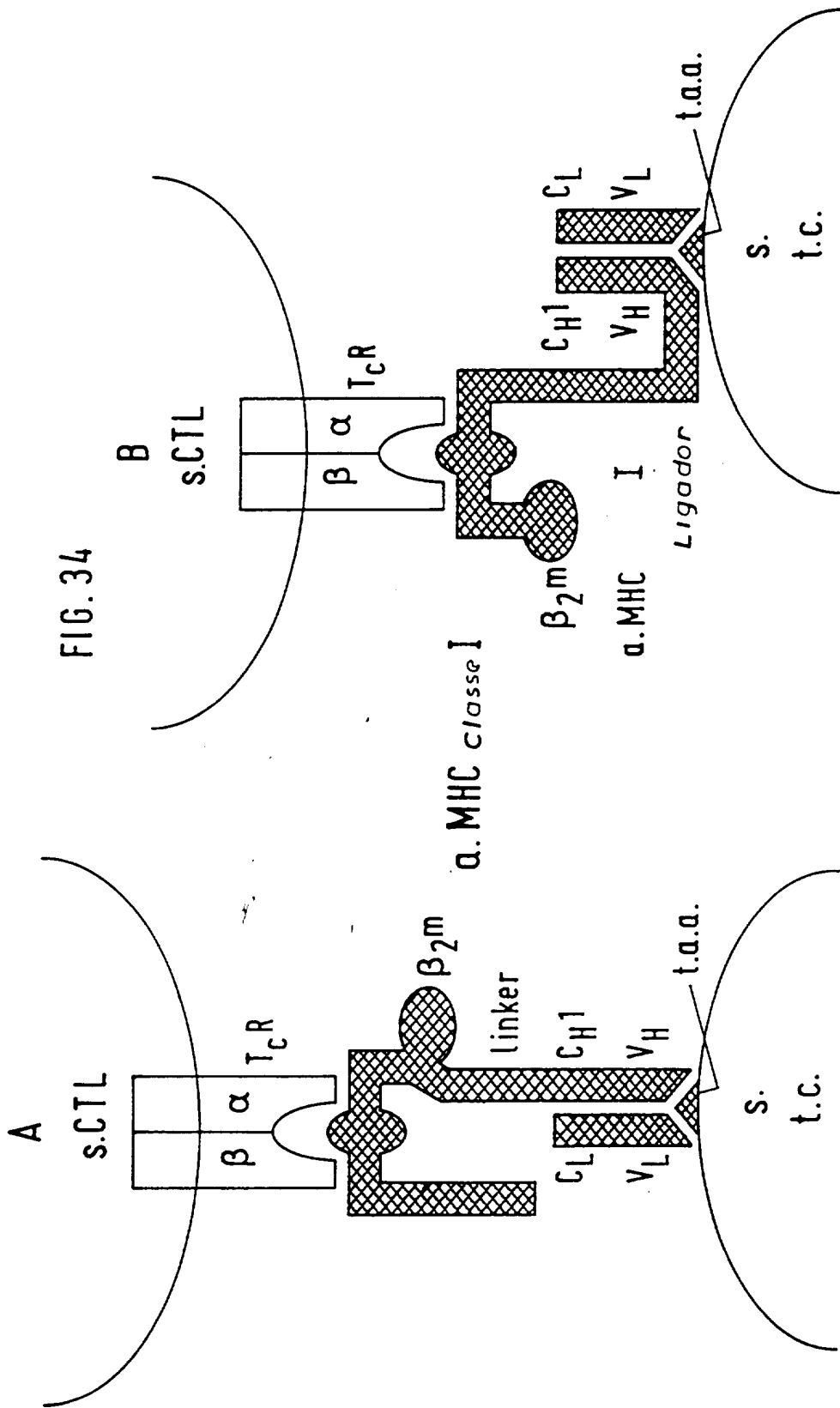


FIG. 34