

ONCOGEN

"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS QUIMÉRICOS MEDIANTE
RECOMBINAÇÃO DE HOMÓLOGOS"

IndicePagina

1. Introdução
2. Antecedentes da invenção
 - 2.1. Anticorpos quiméricos
 - 2.2. Recombinação de homólogos
3. Resumo da invenção
 - 3.1. Definições
4. Descrição das figuras
5. Descrição detalhada da invenção
 - 5.1. Vectores alvo
 - 5.1.1. Sequência alvo
 - 5.1.2. Gene de substituição
 - 5.1.3. Marcador seleccionável e outros elementos
 - 5.2. Transfecção de linhas de células produtoras de anticorpos
 - 5.3. Sondagem e selecção de recombinantes
6. Exemplo: Substituição da região estável de uma cadeia pesada de imunoglobulina murina pela região estável de gama imunoglobulina 1 humana
 - 6.1. Materiais e métodos
 - 6.1.1. Transfecção
 - 6.1.2. Sondagem de transfectantes para recombinantes bem sucedidos
 - 6.1.3. Manchas de Southern e Western

- 6.2. Construção de plasmídeos alvo que codificam a região estável de imunoglobulina humana
- 6.3. Transfecção e recombinação de homólogos
 - 6.3.1. Co-Transfecção de células de mieloma murino
 - 6.3.2. Identificação de células secretoras de imunoglobulinas quiméricas
- 7. Exemplo: Produção da cadeia pesada de imunoglobulina quimérica com especificidade para antígenos L20 associados com tumor humano
 - 7.1. Construção de Vector alvo e hibridoma L20
 - 7.2. Caracterização de cadeia pesada de L20 quimérico expresso
 - 7.2.1. Análise de manchas de Western
 - 7.2.2. Análise citométrica (Flow Cytometric Analysis)
 - 7.2.3. Análise de manchas de Southern
 - 7.2.4. Análise de A.D.C.C.
 - 7.3. Produção de cadeia pesada de L20 quimérico por meio de um vector alvo diferente
- 8. Construção de cadeias pesadas de G28.1 quimérico
- 9. Construção de cadeias pesadas de L6 quimérico.

1. INTRODUÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de anti-corpos quiméricos utilizando vectores de DNA recombinantes novos e recombinação de homologos in situ. As estruturas de DNA recombinante da presente invenção podem ser utilizadas para transferir células que produzem anti-corpos de tal modo que a recombinação de homologos desejada ocorre em células transfectadas que conduzem à produção de moléculas de anti-corpos quiméricos por células transfectadas.

A presente invenção é posta em evidência através de exemplos descritos em que as regiões estáveis de uma cadeia pesada de imunoglobulina murina foram substituídas por regiões estáveis de imunoglobulina G1 humana e cadeias pesadas quiméricas foram produzidas por linhas de células murinas.

2. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

2.1. ANTI-CORPOS QUIMÉRICOS

Desde o desenvolvimento da técnica de fusão de células para a produção de anti-corpos monoclonais (Kohler and Milstein, Nature (London) 256:496, 1975), que um grande número de anti-corpos monoclonais, muitos dos quais até ao momento definem antigénios desconhecidos, tem sido produzido por diversos investigadores. Infelizmente, a maior parte dos anti-corpos monoclonais preparados até ao momento são produzidos num sistema murino e, portanto, tem uma utilidade limitada como agentes terapêuticos humanos a menos que sejam modificados de algum modo para que os anti-corpos monoclonais murinos não sejam reconhecidos como epitopes estranhos e "neutralizados pelo sistema

imunológico humano.

Uma série de investigadores, todavia, tem tentado desenvolver anti-corpos monoclonais humanos que sejam menos "reconhecidos" como epitopes estranhos e possam superar os problemas associados com a utilização dos anti-corpos monoclonais nos seres humanos.

Obviamente, a técnica de hibridoma desenvolvida por Kohler e Milstein (supra) e que envolve o sacrifício de murinhos imunizados e utilização dos seus baços como fonte de linfócitos para subsequente fusão para imortalizar linhas de células que produzem anti-corpos, não pode ser praticada em seres humanos. Portanto, alguns investigadores dirigiram a sua atenção para as recentes descobertas no campo da biologia molecular que permitem a introdução de DNA em células de mamífero para se obter a expressão de genes de imunoglobulina (Oi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:825, 1983; Potter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7161, 1984), e para produzir, mediante a utilização destas técnicas, anti-corpos quiméricos (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6581, 1984; Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066, 1986; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214, 1987).

Os anti-corpos quiméricos são moléculas de imunoglobulina que compreendem uma fracção humana e não humana. Mais especificamente, a região que combina o antígeno (ou a região variável) de um anti-corpo quimérico é proveniente de uma fonte não humana, (por exemplo murina), e a região estável do anti-corpo quimérico (que confere a função de efector biológico à imunoglobulina) é derivada de uma fonte humana. O anti-

-corpo quimérico tem que ter uma especificidade de ligação ao antigénio da molécula do anti-corpo não humano e a função efectora conferida pela molécula de anti-corpo humano.

De um modo geral, os métodos utilizados para se obterem estes anti-corpos quiméricos consistem nos passos seguintes (a ordem de alguns passos pode ser intermutável):

a) identificação e clonagem do segmento genético correcto que codifica a fracção que se liga ao antigénio da molécula do anti-corpo; este segmento genético (conhecido como VDJ, variável, diverso e que junta regiões de cadeias pesadas ou VJ, variável que junta regiões de cadeias leves (ou simplesmente V ou região variável) pode ser ou o cDNA ou uma forma genómica;

b) clonagem de segmentos genéticos que codificam a região estável ou a sua fracção desejável;

c) ligação da região variável com a região estável de tal modo que o anti-corpo quimérico completo seja codificado sob uma forma traduzível e susceptível de ser transcrita;

d) ligação desta estrutura num vector que contenha um marcador seleccionável e regiões de controlo genéticas tais como promotores intensificadores e sinais de poli(A) adição;

e) amplificação desta estrutura na bactéria;

f) introdução do DNA em células eucariotas (transfecção) a maior parte das vezes linfócitos de mamíferos;

g) selecção de células que expressem o marcador seleccionável;

h) sondagem de células que expressem o anti-corpo qui-

mérico desejado; e

i) ensaio do anti-corpo para a especificidade de ligação apropriada e funções efectoras.

Anti-corpos de diversas especificidades que se ligam a antigénios distintos têm sido manipulados por estes protocolos de modo a produzir proteínas quiméricas (por exemplo, anti-TNP: Boulianne et al., Nature Vol. 312 pags. 643, 1984; e antigénios anti-tumorais: Sahagan et al., J. Immunol. Vol. 137:1066, 1986). Do mesmo modo diversas funções efectoras diferentes têm sido obtidas mediante ligação de novas sequências às que codificam a região que liga o antigénio. Algumas destas incluem enzimas (Neuberger et al., Nature 312:604, 1984), regiões estáveis de imunoglobulina de outras espécies e regiões estáveis de outra cadeia de imunoglobulina (Sharon et al., Nature 309:364, 1984; Tan et al., J. Immunol. Vol. 135:3565-3567, 1985).

2.2. RECOMBINAÇÃO DE HOMOLOGOS

Outro processo recente no campo da biologia molecular foi a descoberta de células de mamífero cultivadas que integram DNA plasmídico exógeno no DNA cromossómico no local do cromossoma que contém sequências homologas às sequências plasmídicas. Este facto é preferido como recombinação de homologos (Folger, et al., Mol. Cell. Biol. 2, 1372-1387, 1982; Folger et al., Symp. Quant. Biol. 49, 123-138, 1984; Kucherlapak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1391-1395, 1985; Robert de Saint Vincent, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2002-2006, 1983; Shaul, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82,

3781-3784, 1985).

Células de mamíferos que também contêm maquinaria enzimática para integrar DNA plasmídico em sítios cromossômicos aleatórios, referem-se como recombinações de não homologos. A frequência de recombinação de homologos é referida como sendo elevada e compreendida entre 1/100 e 1/1000 das recombinações realizadas enquanto que a maior parte das recombinações resulta da interação de não homologos (Thomas et al., Cell 44:419-428, 1986; Smithies et al., Nature 317:230-234, 1985; Shaul, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3781-3784, 1985; Smith, et al., Symp. Quant. Biol. 49, 171-181, 1984; Subramani, et al., Mol. Cell. Biol. 3, 1040-1052, 1983). A existência de maquinaria celular para recombinação de homologos torna possível modificar os genes endogenos in situ. Em alguns casos descobriram-se condições em que a sequência cromossômica pode ser modificada pela introdução nas células de um DNA plasmídico que contém um segmento de DNA homólogo ao local desejado e um segmento de novas sequências com a modificação desejada (Thomas et al., Cell. 44:419-428, 1986; Smithies et al., Nature 317:230-234, 1985; Smith et al., Symp. Quant. Biol. 49, 171-181, 1984).

A recombinação de homologos entre DNA cromossômico de células de mamíferos e DNA plasmídico exógeno pode resultar na integração do plasmídeo ou na substituição de algumas das sequências cromossômicas por sequências plasmídicas homólogas. O processo de substituição de sequências de DNA homólogas é designado por conversão genética. A integração e a conversão pode resultar no posicionamento desejado da nova sequência no local endógeno desejado. Contudo, o pro-

cesso de recombinação de homologos tem sido estudado principalmente utilizando genes que permitem uma selecção dominante tal como NEO e HPRT e apenas para um número muito pequeno de tipos de células (Song et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6820-6824, 1987; Rubinitz and Subramani, Mol. Cell. Biol. 6:1608-1614, 1986; e Liskay, Cell 35:157-164, 1983). Não foi determinado se os linfócitos ou as células de mieloma são ou não susceptíveis de ocorrências tais como mediação ou se os genes de imunoglobulina podem ser totalmente alcançados ou reconstruídos por este tipo de processo.

3. RESUMO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para modificar moléculas de anti-corpo e para criar e produzir moléculas de anti-corpos quiméricos em que a região que combina com o antigénio está ligado (a) a uma região estável de imunoglobulina ou a uma sua fracção que confere uma característica desejada, tal como uma função efectora, classe (por exemplo, IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE) origem (por exemplo, espécie humana ou outra espécie); ou (b) a um outro tipo de molécula que confere qualquer outra função à molécula do anti-corpo quimérica (por exemplo, uma enzima, toxina ou um peptido biologicamente activo, um inibidor do factor crescimento, ou um peptido ligante para facilitar a conjugação a um fármaco, toxina ou outra molécula, etc.).

A presente invenção utiliza novos vectores de DNA recombinante para obter a modificação do gene desejado realizada por recombinação de homologos em (a) linhas de células que produzem anti-corpos que têm as especificidades antigénicas

desejadas, de tal modo que o sítio que combina com o antigénio de uma molécula de anti-corpo permanece inalterado, mas a região estável da molécula de anti-corpo, ou uma sua fracção, é substituída ou modificada; ou (b) linhas de células que produzem anti-corpos de classes desejadas que podem demonstrar funções efectoras desejadas, de tal modo que a região estável de uma molécula de anti-corpo permanece inalterada, mas a região variável da molécula de anti-corpo ou uma sua fracção, é substituída ou alterada.

De acordo com um aspecto da presente invenção, um novo vector de DNA recombinante é utilizado para transfectar uma linha de células que produz um anti-corpo que possui uma especificidade antígenética desejada.

O vector de DNA recombinante novo contém um "gene de substituição" para substituir toda ou uma fracção do gene que codifica a região estável de imunoglobulina na linha de célula (por exemplo, um gene de substituição pode codificar toda ou uma fracção de uma região estável de uma imunoglobulina humana uma classe de imunoglobulina específica ou uma enzima, uma toxina, um péptido biologicamente activo, um factor de crescimento, um inibidor ou um péptido de ligação para facilitar a conjugação ao fármaco, à toxina ou a outra molécula, etc.) e uma "sequência alvo" que permite a recombinação de homologos e a conversão do gene desejado com a célula que produz anti-corpo.

Num aspecto alternativo da presente invenção utiliza-se um vector de DNA novo para se transfectar uma linha de células que produz um anti-corpo que tem a função efectora desejada, caso em que o gene de substituição contido num novo vecto

recombinante pode codificar toda ou uma fracção da região de uma molécula de anti-corpo que possui a especificidade anti-génica desejada e a sequência alvo contida no vector recombinante que permite a recombinação de homologos e a modificação do gene desejado na célula que produz o anti-corpo.

Num outro aspecto, apenas quando uma fracção da região variável ou da região constante é substituída o anti-corpo quimérico resultante pode definir o mesmo antigénio e/ou possuir a mesma função efectora contudo a ser modificada ou melhorada de maneira que o anti-corpo quimérico possa demonstrar uma especificidade antigénica maior, ou uma afinidade de ligação estável maior, uma função efectora aumentada ou uma secreção e produção aumentadas por um anti-corpo transfectado que a linha de células produz, etc.

Independentemente do aspecto praticado, os processos de selecção para a sondagem do DNA integrado (via um marcador seleccionável), para a produção de anti-corpos quiméricos e clonagem celular podem ser utilizados para se obter um clone de células que produzem o anti-corpo quimérico.

Assim, uma fracção de DNA que codifica uma modificação para um anti-corpo monoclonal pode ser alcançada directamente no sítio do gene de imunoglobulina expresso, com uma célula-B ou uma linha de células de hibridoma. As estruturas de DNA para qualquer modificação particular podem ser utilizadas para alterar o produto proteínico de qualquer linha de células monoclonal ou hibridoma. Um processo destes torneia o dispêndio de tempo e o custo elevados para a clonagem quer dos genes da região variável de cadeia leve, quer de cadeia pesada de cada

clone de célula-B que exprime uma especificidade antigénica utilizável. Além disso, para ultrapassar o processo de clonagem de genes de região variável, o nível de expressão do anti-corpo quimérico deve ser maior quando o gene está na sua localização cromossómica natural do que quando está numa posição aleatória.

3.1. DEFINIÇÕES

Os termos que se seguem, tal como aqui utilizados, quer no singular quer no plural, têm os significados indicados:

Anti-corpo Quimérico- uma molécula de anti-corpo em que (a) uma região estável, ou uma sua fracção é alterada, substituída ou trocada de tal modo que o sítio de ligação com o antígeno (região variável) é ligado a uma região estável de uma classe diferente ou modificada, função efectora e/ou espécies, ou uma molécula inteiramente diferente que confere novas propriedades ao anti-corpo quimérico, por exemplo, uma enzima, toxina, hormona, factor de crescimento, fármaco, etc; ou (b) a região variável ou uma sua fracção é alterada, substituída ou trocada com uma região variável, que possui uma especificidade antigénica diferente ou modificada.

Gene de Substituição: um gene que codifica um produto para substituir toda ou uma parte da região estável ou a região variável de uma molécula de anti-corpo para formar uma molécula de anti-corpo quimérico. Os genes de substituição são construídos em vectores alvo de DNA recombinante novos da presente invenção que são utilizados para transfectar linhas de células produtoras de anti-corpos. Para a modificação de

toda ou uma parte da região estável os genes de substituição da presente invenção podem incluir mas não estão limitados a uma região estável de imunoglobulina que possui uma função efectora particular, classe e/ou origem (por exemplo, regiões constantes de IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE de imunoglobulinas humanas ou de qualquer outra espécie) ou uma porção de uma região estável que modifica a actividade ou propriedades da região estável da imunoglobulina; assim como genes que codificam outras moléculas que conferem qualquer nova função a uma molécula de anti-corpo quimérico, por exemplo, uma enzima, toxina, hormona, factor de crescimento, ligante conjugável, etc.

Para a modificação de toda ou de uma parte de uma região variável, genes de substituição da presente invenção podem incluir, mas não estão limitados, a regiões variáveis de imunoglobulina que codificam uma região variável diferente que possui uma afinidade antigénica diferente ou uma especificidade antigénica diferente ou uma fracção de uma região variável que modifique a actividade ou propriedade da região variável da imunoglobulina resultando anti-corpos quiméricos que possuem uma afinidade maior e um grau superior de especificidade para o antígeno.

Sequência Alvo: uma sequência homologa às sequências de DNA que ladeiam ou que ocorrem adjacentes à região a ser convertida de uma molécula de anti-corpo do cromossoma de uma célula que produz a molécula do anti-corpo. As sequências alvo são construídas em vectores de DNA recombinantes novos da presente invenção que são utilizados para transfectar linhas de

células produtoras de anti-corpos.

Sequências alvo para recombinações de cadeia pesada que dirigem a substituição ou a inserção de toda ou uma parte de uma região estável podem incluir, mas não estão limitados ao total ou a uma fracção de V, D, J, e a região de desvio (incluindo sequências intervinientes designadas por intrões) e sequências flanqueadoras associadas ou adjacentes ao gene da região estável da cadeia pesada particular expresso pela linha de células que produz os anti-corpos, destinada a ser transfectada e podem incluir regiões localizadas em ou a jusante da região estável (incluindo intrões).

As sequências alvo para recombinações de cadeia leve que dirigem a substituição ou a inserção de toda ou de uma parte da região estável podem incluir mas não estão limitadas às regiões V e J, suas sequências flanqueadoras a montante e sequências intervinientes (intrões), associadas, ou adjacentes a um gene da região estável de cadeia leve expresso pela linha de células que produz anti-corpos destinada a ser transfectada e que podem incluir regiões localizadas na região estável ou a jusante dela (incluindo intrões).

As sequências alvo para recombinações de cadeia pesada que dirigem a substituição ou a inserção de toda ou de uma parte da região variável podem incluir mas não estão limitadas a toda ou uma parte das regiões V, D e J (incluindo intrões) e sequências flanqueadoras associadas ou adjacentes ao, gene da região variável particular expresso pela linha de células que produz anti-corpos a ser transfectada.

As sequências alvo para as recombinações de cadeia leve

que dirigem a substituição ou a inserção de toda ou de uma parte da região variável podem incluir mas não estão limitadas às regiões V e J (incluindo intrões) e sequências flanqueadoras associadas ou adjacentes ao gene da região variável de cadeia leve expressada pela linha de células que produz anti-corpos destinada a ser transfectada.

Vector Alvo: um vector nucleotídico recombinante que compreende uma sequência alvo e um gene de substituição que pode ser utilizado para construir a produção de anti-corpos quiméricos por células que produzem anti-corpos transfectadas com o vector alvo. Os vectores alvo são utilizados para transfectar linhas de células que contém sequência(s) homologas aos vectores alvo dos vectores e produzem um anti-corpo que possui (a) uma especificidade antigénica desejada; (b) uma região estável desejada; ou (c) outra qualidade desejada como por exemplo elevados níveis de secreção, adaptabilidade de cultura em grande escala, etc.

As abreviações que se seguem têm os seguintes significados:

FITC: isotiocianato de fluoresceína
 HRP: peroxidase de rabano
 hu: humano
 huC γ 1: exões da região estável da gama imunoglobulina 1 humana
 huIgG: imunoglobulina gama humana
 m: murganho
 mAB: anti-corpo monoclonal
 mIgG: gama imunoglobulina de murganho.

4. DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1- representa por meio de um diagrama um esquema generalizado para a substituição genética via recombinação de homologos utilizando vectores alvo da presente invenção. (V) variável, (D) diversidade, (J) junção, (S) desvio, e (C) estável, referem-se às regiões. A sequência A representa esquematicamente a substituição de toda ou de uma fracção da região estável ou variável de genes de cadeia pesada utilizando uma sequência alvo homologa a qualquer fracção que se estende nas regiões V, D, E, J, S e C. O painel B representa esquematicamente a substituição de toda ou de uma parte da região estável ou variável dos genes de cadeia leve utilizando uma sequência alvo homologa a qualquer porção que se situa na região V, J e C. O esquema C representa a substituição de toda ou de uma parte das regiões variável ou estável dos genes de cadeia leve ou de cadeia pesada utilizando-se sequências que flanqueiam o gene que se destina a ser substituído.

Figura 2- representa por meio de um diagrama a construção de um plasmídeo alvo de pRSV-140-neo/HuC-gama 1/MuJ4/e. A sequência alvo incorpora um fragmento de 2,2 kb Hind III proveniente de um sítio de cadeia pesada de imunoglobulina murina (IgG) que contém a quarta região de junção (J4), o intensificador de IgG (e) e sequências de intrões 5' à região de desvio. A sequência alvo está em posição 5' relativamente ao gene de substituição que incorpora um fragmento de 7,0 kb Hind III-Bam HI do sítio de cadeia pesada de IgG1 humana que contém a região estável gama 1 humana.

Figura 3- Mapa de vector de recombinação IgG1 humana. O vector é constituído por um fragmento de 2,2 kb Hind III que contém o intensificador de cadeia pesada murino que foi modificado para eliminar um sítio Xba I, um fragmento de 3,0 kb Hind III/Pvu II que contém os exões da região estável de huc γ 1, humana, o fragmento de 2,0 kb Bgl II/Bam HI derivado de pSV2/neo que codifica neo, um fragmento de 667 pares de bases Bal I/Sst I que incorpora o intensificador e o promotor de CMV humano e um fragmento com 2,3 kb Pvu II/Hind III do pBR322 que inclui a origem de replicação do gene resistente à ampicilina.

O fragmento Bal I/Sst I que contém CMV foi transferido para os sítios Sst I/Hinc III de pEMBL 18, retirado sob a forma de um fragmento Hind III/Sst I e clonado entre os mesmos sítios em Pic19R, a seguir isolado como um fragmento Sma I/Bgl II para colocar entre os sítios Pvu II e Bgl II na estrutura.

De um modo idêntico o fragmento Hind III/Pvu comportando os exões de c gama 1 humana foi clonado nos sítios Hind III e Hind II do Puc 9, e a seguir transferido como um fragmento Hind III/Bam HI.

Figura 4- Plasmídios adicionais utilizados para atingirem as sequências c gama 1 humanas. Os plasmídios representados nas Figuras 4A e 4B são como descritos para o plasmídio representado na Figura 3, excepto: ambos os plasmídios representados nas Figuras 4A e 4B possuem o Bgl II/Pvu II com 500 pares de bases contendo o intensificador SV40 e o promotor do plasmídio pSV2 neo (J. Molec. Appl. Genet. 1:327-341, 1982),

em substituição do promotor e intensificador CMV, e o plasmídeo 4B incorpora um fragmento de 7 kb, Hind III/Bam HI da c gama 1 humana mais a sequência adjacente dos exões da região estável.

5. DESCRIÇÃO DETALHADA DA PRESENTE INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um processo para a produção de anti-corpos quiméricos utilizando novos vectores de DNA recombinantes para dirigir uma alteração de sequência desejada para uma localização específica no genoma via recombinação de homólogos in vivo. Utilizando o método desta invenção a sequência de proteína de uma molécula de anti-corpo pode ser modificada por transfecção do anti-corpo da linha de células que produzem anti-corpos com um "vector alvo" apropriado.

Num aspecto da presente invenção uma linha de células que produz uma molécula de anti-corpo exibindo uma especificidade antigénica desejada é transfectada com um vector alvo desta invenção que compreende uma molécula de DNA recombinante que codifica um "gene de substituição" e uma "sequência alvo". O gene de substituição codifica a molécula desejada que é para substituir toda ou uma parte da região estável da molécula de anti-corpo expressa pela linha de células. Por exemplo, o gene de substituição pode codificar toda ou uma fracção de uma região estável de imunoglobulina que exhibe uma função efectora particular, classe e/ou origem, incluindo mas não limitado a regiões estáveis de IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE humanas ou qualquer outra espécie desejada; de um modo alter-

nativo o gene de substituição pode codificar outro tipo de molécula que pode conferir qualquer outra função ao anti-corpo quimérico resultante, por exemplo uma enzima, toxina, um peptido activo biologicamente, factor de crescimento, inibidor, ligante de peptido conjugável, etc.

A sequência alvo do vector alvo é homologa das sequências de DNA encontradas no cromossoma ou adjacentes à sequência codificadora do gene madura para a região estável da imunoglobulina produzida pela linha de células a ser transfectada ou uma fracção apropriada da sequência codificadora madura para a região estável. Após transfecção, ocorrerá a recombinação de homologos na linha de células produtora de anti-corpos; algumas destas recombinações conduzirão à substituição de toda ou de uma parte da região do gene de imunoglobulina com o gene de substituição, e, portanto, a expressão das moléculas de anti-corpo quimérico pelas células transfectadas.

Num aspecto alternativo da presente invenção, uma linha de células que produz uma molécula de anti-corpo possuindo a região estável desejada é transfectada com um vector alvo que contém um gene de substituição que codifica toda ou uma parte de uma região variável que possui uma especificidade antigénica desejada e uma sequência alvo que dirige a modificação genética de toda ou de uma parte da região codificadora variável no cromossoma da célula hospedeira. Após transfecção, ocorrerá a recombinação de homologos na linha de células produtora de anti-corpos; algumas destas recombinações conduzirão à substituição de toda ou de uma parte da

região variável do gene de imunoglobulina com o gene de substituição e, portanto, a expressão de moléculas de anti-corpo quimérico pelas células transfectadas.

Logo que o transfectante que expressa o anti-corpo quimérico é identificado, a prática da presente invenção envolve a cultura do transfectante e isolamento de moléculas de anti-corpo quimérico a partir do sobrenadante da cultura de células utilizando-se técnicas convencionais conhecidas para o isolamento de anti-corpos monoclonais. Alternativamente as células transfectadas podem ser cultivadas em líquido ascítico em animais e recolhidas por meio de técnicas habituais utilizadas para o isolamento de anti-corpos monoclonais.

Aspectos diversos da presente invenção estão descritos com mais detalhe nas sub-seções que se seguem e demonstrados através de exemplos em que são produzidas imunoglobulinas quiméricas humanas e de murganho de cadeias pesadas. Para clarificação da descrição da presente invenção será descrito como se segue: (a) vectores alvo; (b) transfecção; e (c) sondagem e selecção de transfectantes que produzem moléculas de anti-corpos quiméricos.

5.1. VECTORES ALVO

Como se explicou anteriormente, os vectores alvo da presente invenção incorporam vectores de DNA recombinante que incluem mas não estão limitados a plasmídios, fagos, fagomídios, cosmídios, vírus e equivalentes que contêm o gene de substituição e a sequência alvo. Como descrito mais detalhadamente a seguir, o gene de substituição pode incorpo-

rar qualquer número de genes que codifica um produto estrutural desejado enquanto que a sequência alvo pode variar de pendente do tipo da molécula de anti-corpo que se quer converter e o tipo de célula animal que se destina a transfecção.

A sequência alvo e o gene de substituição estão colocados no vector alvo de forma que a transfecção da linha de células que produz anti-corpos apropriada com o vector alvo resulta numa recombinação de homologos desejados de tal modo que a conversão do gene é realizada pela inserção específica do sítio do gene de substituição no gene do anti-corpo.

Os vectores alvo da presente invenção podem conter outros genes que codificam marcadores seleccionáveis, por exemplo resistência a um fármaco, enzima, para auxiliar a sondagem e selecção de transfectantes ou podem ser co-transfectados com esses marcadores. Outras sequências que podem reforçar a ocorrência de recombinações também podem ser incluídas. Estes genes podem incluir mas não estão limitados a qualquer enzima de recombinação eucariota ou procariota tal como REC A, topoisomerase, REC 1 ou outras sequências de DNA que induzem a recombinação destes como CHI. Proteínas diversas tais como as que codificam para os genes referidos antes também podem ser transfectadas a fim de aumentar a frequência de recombinação. As sequências alvo diversas, genes de substituição e marcadores seleccionáveis que podem ser utilizados de acordo com o método da presente invenção estão descritas posteriormente.

5.1.1. SEQUÊNCIA ALVO

A composição da sequência alvo pode variar dependendo do plasmídeo alvo a utilizar para substituir quaisquer genes da região constante ou da região variável de cadeia leve ou de cadeia pesada e ainda da espécie animal da célula do hospedeiro que produz os anti-corpos. Mais especificamente as sequências alvo têm que ser homologas às sequências que são adjacentes ou que flanqueiam a região codificadora para a região estável ou para a região variável ou para a sua fração a ser substituída ou alterada.

Por exemplo, num cromossoma, genes de cadeia pesada madura são constituídos pelas regiões VDJ, nos seus terminais 5'; por exemplo a região variável (V), a região de diversificação (D), e a região de junção (J) seguida por qualquer das restantes regiões (J), não são expressas (o número de regiões J varia com a espécie) e sequências de intrões. A porção central e a porção 3' do gene consiste nos exões da região estável (flanqueadas e dissimuladas com sequências de intrões e não traduzidas) que podem ser de uma ou de diversas classes (por exemplo, mu, delta, gama, epsilon, alfa) cada uma das quais associada com a sua própria região de desvio adjacente. Portanto, a sequência alvo utilizada para recombinação de homologos desejados no gene de cadeia pesada de uma célula hospedeira que produz anti-corpos pode compreender uma região que é homologa com qualquer porção do gene do anti-corpo dependente da alteração que se deseja.

Por exemplo, a sequência alvo para dirigir a substituição das regiões estáveis da cadeia pesada pode compreender

sequências homologas a sequências que abrangem qualquer região própria e que incluem ou excluem a região de desvio que começa com a região V, D, ou J e pode estar colocada de um modo conveniente na construção do vector alvo, por exemplo na localização 5' da região codificadora do gene de substituição. A sequência alvo actual que pode ser utilizada pode variar com a espécie animal da célula hospedeira alvo e classe do anti-corpo expresso pela célula do hospedeiro alvo.

Em contraste com a disposição dos genes de cadeia pesada num cromossoma, os genes de cadeia leve maduros são compostos por uma região VJ no seu terminal 5', sequências de intrões e um exão da região estável simples. Assim, a sequência alvo utilizada para a recombinação de homologos alvo no gene de cadeia leve de uma célula hospedeira que produz anti-corpos pode abranger uma região que é homologa com qualquer fracção do gene dependendo da alteração desejada. Por exemplo, a sequência alvo para dirigir a substituição das regiões estáveis de cadeia leve pode ser homologa das sequências que abrangem toda ou parte de regiões V e J apropriadas através de sequências de intrões que precedem a região codificadora para a região estável da cadeia leve. Estas sequências alvo deverão estar colocadas de um modo adequado no plasmídeo alvo, por exemplo na localização 5' da sequência codificadora para o gene de substituição. Uma vez mais, a sequência nucleotídica actual da sequência alvo pode variar com respeito à espécie animal da célula que produz o anti-corpo do hospedeiro alvo.

Além disso, para as sequências descritas antes a sequência alvo pode incluir sequências homologas às regiões adjacentes aos terminais 5' e/ou 3' da região codificadora para a cadeia estável, leve ou pesada e, portanto, deverá estar colocada de um modo apropriado na estrutura do vector alvo; isto é na localização 5' e/ou 3', respectivamente, da região codificadora dos genes de substituição.

De um modo idêntico as sequências alvo para dirigirem a substituição de regiões variáveis de cadeia leve ou de cadeia pesada podem abranger sequências homologas a toda ou a parte das regiões apropriadas que flanqueiam a região variável. Em qualquer caso, as sequências alvo podem ainda incluir sequências da região codificadora que flanqueiam uma área num exão onde apenas uma fracção da região estável ou variável deve ser substituída de modo a que a proteína expressa é alterada de um modo desejado.

5.1.2. GENE DE SUBSTITUIÇÃO

Como se explicou anteriormente, os genes de substituição utilizados para converter regiões estáveis de anti-corpo podem abranger a sequência codificadora para toda ou parte da região estável, de uma imunoglobulina de uma classe e/ou espécie animal ou humana diferente. Assim, no caso de cadeias pesadas, o gene de substituição pode abranger toda ou uma parte do gene que codifica as regiões estáveis de IgM, IgD, IgG, IgE, e IgA humana ou qualquer sua sub-classe. De um modo alternativo, o gene de substituição pode codificar um produto que pode conferir uma função efectora diferente à

molécula quimérica que será expressa. Por exemplo, uma enzima, toxina, factor de crescimento, peptido biologicamente activo, ligante, etc.

O gene de substituição pode também consistir em qualquer associação das sequências anteriormente referidas por exemplo toda ou uma fracção de uma região estável de anti-corpo ligada a uma sequência proteínica nova.

O gene de substituição escolhido depende, em parte, da utilização destinada para a molécula de anti-corpo quimérico expressa. Por exemplo, se se destina à utilização terapêutica em seres humanos então o gene de substituição pode codificar uma região estável humana, de preferência de uma classe que possua uma função efectora desejada para utilização terapêutica. Se se pretende uma melhoria ou alteração na função efectora existente do anti-corpo, uma fracção da região estável pode ser substituída com uma sequência que confere essa função efectora melhorada ou alterada para a molécula de anti-corpo quimérico resultante. Se se pretende a distribuição alvo de uma enzima, toxina, fármaco, hormona ou factor de crescimento in vivo, deve ser utilizado um gene de substituição que codifica a enzima, toxina, fármaco, hormona ou factor de crescimento ou um ligante apropriado para tal conjugação. Se anti-corpos quiméricos são utilizados para ensaios de diagnóstico, por exemplo quando são utilizados anti-corpos marcados, deve ser utilizado um gene de substituição que codifica uma enzima ou o seu substrato. Estes sistemas substrato/enzima incluem mas não estão limitados àqueles que produzem um produto corado após reacção, por exemplo beta-

galactosidase, fosfatase alcalina, peroxidase de rábano e idênticas. Os anti-corpos quiméricos resultantes podem ser utilizados como anti-corpos marcados nos procedimentos projetados com ou sem outra modificação, por exemplo a liga-ção química de enzimas, fármacos, toxinas, hormonas, factores de crescimento, etc.

O gene de substituição utilizado para converter regiões variáveis de anti-corpo pode abranger toda ou uma fracção da sequência codificadora para uma região variável de uma molécula de anti-corpo que define um antigénio desejado. Estas podem codificar as regiões que se ligam ao antigénio, que definem antigénios relacionados ou completamente distintos. Se se pretende a melhoria ou alteração de uma ligação do antigénio ou na especificidade, pode ser substituida uma fracção de uma região variável por uma sequência que confere essa melhoria ou alteração da ligação ou da especificidade para a molécula do anti-corpo quimérico resultante.

5.1.3. MARCADOR SELECCIONÁVEL E OUTROS ELEMENTOS

Em adição à sequência alvo e ao gene de substituição, o vector alvo da presente invenção pode codificar um marcador seleccionável o qual intervém na sondagem e selecção das cé-lulas que produzem anti-corpos que foram transformadas com sucesso. Estes marcadores incluem genes de resistência a fármacos tais como gpt, neo, his, etc.

Outros elementos que podem reforçar o número de recombinações efectuadas podem ser incluídos no vector alvo. Por exemplo, uma origem de replicação (ori) que é sensível à tem-

peratura (por exemplo, sistema ori de polioma tsA) que pode ser incluído na estrutura de modo a que o desenvolvimento dos transfectantes a uma temperatura permissiva resulta num vector de replicação em que o número de cópias da sequência alvo e o gene de substituição são aumentados e, subsequente^{mente} o número de recombinações pode aumentar. Outros sistemas ori podem também ser utilizados para aumentar o número de cópias (factores mais ori EBV, factores mais ori BPV, ou ori SV40 e antigénio T).

5.2. TRANSFECCÃO DE LINHAS DE CÉLULAS QUE PRODUZEM ANTI-CORPOS COM VECTORES ALVO

De acordo com o método da presente invenção uma linha de células que produz um determinado anti-corpo (isto é, que tem uma especificidade antigénica pretendida ou uma região estável pretendida) é transfectada com o vector alvo apropriado para produzir transfectantes que sofrerão a recombinação de homologos de sítio dirigido.

Podem ser utilizados vectores alvo de cadeia pesada e de cadeia leve para transfectar uma linha de células produtora de anti-corpos apropriada, contudo, em muitos casos a transfecção com um vector alvo de cadeia pesada pode ser suficiente para obter a expressão de uma molécula de anti-corpo quimérico. A transfecção pode realizar-se por qualquer dos métodos conhecidos habituais que incluem mas não estão limitados à precipitação com fosfato de cálcio, electroporação, microinjecção, fusão de limpossomas, fusão de imagem de RBC, fusão de protoplasma, etc. Um vector alvo pode ser linearizado

por cisão com uma enzima de restrição numa sequência alvo antes da transfecção a fim de se aumentar a probabilidade de recombinações de homologos na célula transfectada.

5.3. SONDAGEM E SELECÇÃO DE RECOMBINANTES

O teste definitivo para transformação de sucesso, recombinação de homologos e modificação de genes alvo consiste na produção de anti-corpos quiméricos por uma linha de células produtora de anti-corpos. A detecção de transfectantes que produzem os anti-corpos quiméricos pode ser realizado por numerosas vias, dependendo estas da natureza e produto do gene de substituição.

Se o vector alvo contém um marcador seleccionável a sondagem inicial das células transfectadas deve ser para escolher as que exprimem esse marcador. Por exemplo, quando se utiliza um gene de resistência a um fármaco, estes transfectantes que se desenvolvem num meio de selecção que contém o fármaco de outro modo letal, pode ser identificado na sondagem inicial. Uma segunda sondagem é necessária para identificar estes transfectantes que exprimem o anti-corpo quimérico.

O protocolo para a segunda sondagem depende da natureza do gene de substituição. Por exemplo, a expressão de um gene de substituição que codifica uma região estável de uma classe ou de uma espécie de anti-corpo diferente pode ser detectada pelo ensaio de imunologia utilizando-se anti-corpos específicos para uma classe e ou espécie especial de imunoglobulina. De um modo alternativo, pode realizar-se

um bio-ensaio para verificar se o gene de substituição conferiu uma função efectora particular. A expressão de um gene de substituição que codifica uma molécula biologicamente activa como por exemplo uma enzima, toxina, factor de desenvolvimento ou outro peptido pode ser ensaiada relativamente a uma actividade biológica especial; por exemplo os produtos de células transfectadas podem ser ensaiados utilizando-se um substracto de enzima apropriado ou alvo para a toxina, factor de crescimento, hormona, etc. De um modo alternativo, estes produtos de gene de substituição podem também ser submetidos a imunoensaios utilizando-se anti-corpos que são específicos para o produto do gene de substituição.

Também devem ser ensaiados os transfectantes que exprimem o gene de substituição para verificar o reconhecimento do antigénio apropriado. Este ensaio pode ser realizado por um imunoensaio adequado incluindo um imunoensaio competitivo que utiliza os anti-corpos originais e quimérico. Estes testes de sondagem não necessitam de ser realizados sequencialmente e, de facto, podem ser conduzidos simultaneamente utilizando-se um "imunoensaio sandwich" em que um anti-corpo de captura define o produto do gene de substituição (isto é, qualquer das regiões variável ou estável) é utilizado para imobilizar o anti-corpo quimérico e para detectar a presença ou ausência da fracção não alterada, (isto é, qualquer região não alterada, variável ou estável, respectivamente) utilizando um anti-génio marcado ou um anti-corpo marcado, respectivamente.

Por exemplo, o antigénio pode ser utilizado para captu

rar os anti-corpos quiméricos e o produto do gene de substituição da região estável pode ser detectado utilizando-se anti-corpos marcados que definem o produto do gene de substituição, ou mediante um ensaio de captura de anti-corpos quiméricos para determinar a actividade biológica do produto do gene de substituição, (por exemplo enzimático, toxina, hormona, factor de crescimento, etc.).

De um modo alternativo, o anti-corpo quimérico pode ser imobilizado na região estável (utilizando-se por exemplo um anti-corpo específico para aquela região ou proteína A de estafilococos, etc.) e o produto genérico da região variável pode ser detectado por meio de um antigénio marcado ou de um anti-corpo anti-idiotipo.

6. EXEMPLO: SUBSTITUIÇÃO DA REGIÃO ESTÁVEL DE UMA CADEIA PESADA DE IMUNOGLOBULINA MURINA COM A REGIÃO ESTÁVEL DE GAMA IMUNOGLOBULINA 1 HUMANA

Os exemplos que se seguem descrevem a estrutura de um plasmídeo alvo que contém uma sequência alvo murina (que codifica a quarta região de ligação e intensificador do gene da cadeia pesada) ligada a um gene de substituição que codifica a região estável de uma gama imunoglobulina 1 (huIgG1).

Este plasmídeo alvo foi utilizado com um fago que continha o gene maduro completo que codifica uma cadeia pesada murina (a região variável e a região estável completas) para células de mieloma murino co-transfectadas que são mutantes de cadeia pesada que normalmente exprimem apenas cadeias leves.

As células transfectadas foram sondadas e identificadas os clones que exprimiam IgG1 humana de cadeia pesada. Estas experiências indicaram a realização bem sucedida da recombinação de homologos, integração nos cromossomas da célula hospedeira, e expressão dos genes da gama globulina 1 humana, no sistema de células murinas.

6.1. MATERIAIS E METODOS

A menos que indicado de outro modo, os materiais e métodos indicados posteriormente, foram utilizados nos exemplos que se seguem.

6.1.1. TRANSFECCÃO

A transfecção foi realizada por lavagem e nova suspensão de cerca de 10^7 células em PBS (solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato) à temperatura de 4°C com 2 mM de MgCl_2 e 2 mM de CaCl_2 , e transferência das células para um recipiente de plástico estéril guarnecido com folha de alumínio (BioRad, CA). A adição e mistura de DNA linearizado foi feita a uma concentração final de 10-100 $\mu\text{g/ml}$, e em seguida aplicada uma carga eléctrica com um fornecedor de potência apropriada (por exemplo um Gene Pulsar, BioRad, CA). Os recipientes foram agitados cuidadosamente para assegurar uma boa mistura. Após dois minutos à temperatura ambiente as células foram transferidas para 9 ml de meio RPMI (GIBCO) com 10% de FBS à temperatura de 37°C . Após 48 horas de incubação as células viáveis foram recolhidas por centrifugação, contadas e colocadas em placas com uma densidade de 10^3 células/cavidade em

placas de 96 cavidades ou 10^4 células por cavidade em placas de 24 cavidades em meio RPMI com 10% de FBS, 60 mg/ml de penicilina/100 mg/ml de estreptomicina, 1 mM de pirovato de sódio, 292 mg/ml de L-glutamina e 0,1-2 mg/ml de ácido micofenólico ou 1-2 mg/ml de G418. Este meio foi repostado ou mudado todos os dois ou três dias. O desenvolvimento nas cavidades foi verificado após 2 a 3 semanas. Os sobrenadantes provenientes das culturas foram em seguida ensaiados por ELISA para detectar a presença de gama globulina humana e as cavidades positivas foram clonadas e novamente sondadas.

6.1.2. SONDAGEM DE TRANSFECTANTES PARA RECOMBINANTES BEM SUCEDIDOS

Os ensaios de ELISA foram realizados por meio de revestimento de placas de imunolon 2 (Dynatec Labs, Chantilly, VA) com 100 μ l de anti-IgG humana desenvolvida na cabra (Antibodie Inc., Davis, CA) a uma diluição de 1:1000, ou anti-IgA de murganhão desenvolvido na cabra (Cappel) a uma diluição a 1:5000 em tampão de revestimento (NaHCO_3 0,1 M pH 9,6) à temperatura de 4°C durante a noite. As placas foram em seguida cheias com solvente (Genetic Systems) para bloquear durante uma hora à temperatura ambiente após o que foram agitadas, fechadas e conservadas à temperatura de 4°C durante um tempo não superior a 3 semanas.

As placas foram reexaminadas para ensaio mediante lavagem por 3 vezes com tampão de lavagem (NaCl 0,15 M Tween 20 0,05% v/v) e em seguida adicionadas com 100 μ l de sobrenadante padrão ou sobrenadantes de cultura (diluídos em meio apropriado).

do) e incubadas à temperatura de 37°C durante uma hora.

Em seguida as placas foram lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem e procedeu-se à detecção do anti-corpo ligado com 100 µl de peroxidase de rábano (HRP) conjugado com anti-IgG humana desenvolvido em cabra (American Qualex) a uma diluição de 1:6000 ou com anti-IgA de murganho desenvolvido em cabra a uma diluição de 1:5000, ou com anti-lambda de murganho desenvolvido na cabra (Southern Biotech. Ass. Inc. Birmingham, AL) com uma diluição de 1:3000, durante 1 hora à temperatura de 37°C. Em seguida as placas foram lavadas por 3 vezes com tampão de lavagem e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente com uma diluição de 1:100 TMB cromogene em substrato tamponado (Genetic Systems) bloqueadas com 100 µl por cavidade de H₂SO₄ 3M, e imediatamente lidas a 450/630 nm num leitor de microplacas (Genetic Systems). Igualmente, as linhas de células produtoras de kapa podem ser sondadas utilizando um reagente de anti-kapa de murganho desenvolvido na cabra conjugado com HRP (Southern Biotech. Ass. Inc

As linhas de células positivas para IgG humana e/ou IgA murina foram subclonadas por diluição limitante ou em agarose branda para isolar clones de expressão. Para clonar em agarose mole, suspenderam-se de novo aproximadamente 1000 células provenientes de uma cavidade positiva em agarose a 4% e dispozeram-se em camada sobre uma camada de agar de células de exudado peritonial murino. Um a dois dias depois dispos-se uma terceira camada contendo anti-soro específico para IgG1 humana. Os clones positivos foram identificados pela presença de um imunoprecipitado.

6.1.3. MANCHAS DE SOUTHERN E WESTERN

Isolou-se a partir de células DNA de peso molecular elevado essencialmente como o descrito por Blin and Stafford (Blin. N. and Stafford, D.W., 1976, Nucleic Acids Res. 3:2303) e mais tarde por Maniatis, Fritsch and Sambrook (Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY p. 280, 1982) com a exceção de que as células foram primeiramente lavadas com solução de cloreto de sódio tamponada com fosfato padrão (como opostas a Tris) e o tratamento com RNase foi realizado simultaneamente com o tratamento de proteínase K à temperatura de 55°C.

As manchas de Southern e a hibridação foram realizadas como descrito inicialmente por Southern (Southern, J. Mol. Biol. 98:503, 1975) e mais recentemente de um modo detalhado por Maniatis, Fritsch, e Sambrook (Maniatis et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, pp. 383-389 1982). As sondas utilizadas para a hibridação consistiam no fragmento de 1,0 kb Hind III-PstI que continha o primeiro domínio da região estável do gene de IgG humana ou o fragmento com 0,7 kb Hind III-Hind III que codifica os segmentos do gene J_{H2} e J_{H3} murino. A marcação das sondas foi realizada de acordo com o protocolo dos preparadores utilizando-se um conjunto de "Nick Translation" (Bethesda Research Laboratories). As enzimas de restrição foram fornecidas pela Boehringer Mannheim Biochemicals.

A análise de manchas de Western foi realizada como descrito por Towbin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:4350, 1979 e os reagentes de desenvolvimento foram os que

se utilizaram para a detecção no ensaio por ELISA.

6.2. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDIOS ALVO QUE CODIFICAM A REGIÃO ESTÁVEL DE IMUNOGLOBULINA HUMANA

Construiu-se um plasmídeo alvo que consiste num vector plasmídico bacteriano pRSV-140-neo em que foi clonado um fragmento com 8,0 kb Hind III-Bam HI que continha a região estável de gama globulina 1 humana como o gene de substituição (Figura 2). O gene alvo, um fragmento com 2,2 kb Hind III proveniente do locus da cadeia pesada de imunoglobulina murina (IgH) que continha a quarta região de junção (J4), o intensificador de IgH (e) e as sequências de intrões 5' para desligar a região foi inserido no sítio 5' de Hind III do gene de gama globulina 1 humana (Figura 2). Esta estrutura foi em seguida linearizada no único sítio Xba I na sequência alvo murina e transfectada para a linha de células de mieloma murina descrita em seguida por meio de electroporação como descrito anteriormente.

6.3. TRANSFECCÃO E RECOMBINAÇÃO DE HOMOLOGOS

As experiências e resultados descritos anteriormente demonstram o êxito da recombinação de homologos entre o plasmídeo alvo e o gene de cadeia pesada murino contido no fago que foi utilizado para a co-transfecção de uma célula hospedeira de mieloma murina. A integração e recombinação dos homologos no cromossoma da célula hospedeira de mieloma murino resultou na expressão de uma cadeia pesada de imunoglobulina humana (IgG1).

6.3.1. CO-TRANSFECCÃO DE CÉLULAS DE MIELOMA MURINO

O plasmídeo alvo que continha (a) a sequência alvo murina que codifica a quarta região de junção (J4) o intensificador de IgH e as sequências 5' de intrões para a região de interrupção e (b) o gene de substituição que codifica a região estável de IgG1 humana, foi linearizado na região da sequência alvo e co-transfectado numa proporção equimolar com um clone de DNA fágico que continha o gene da cadeia pesada murino J558 funcional, numa linha de células de mieloma murino mutante de cadeia pesada, J558L que exprime apenas cadeias leves. A linha de células transfectada resistente a G418 (um marcador selecionável codificado pela construção plasmídica alvo) foi em seguida sondada para a presença de proteína de IgG1 humana. Uma vez que a região estável de gama globulina 1 humana contida nos plasmídios alvo construídos referidos antes, não possuía a sequência do promotor de imunoglobulina, a detecção da expressão da proteína de IgG humana pela linha de células murina transfectada, teria que ser o resultado de uma recombinação de homologos entre as moléculas de DNA transfectado e a integração no cromossoma da célula hospedeira.

6.3.2. IDENTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS QUIMÉRICAS SEGREGADAS POR CÉLULAS

Foram subclonados transfectantes que segregam proteína de IgG humana e/ou proteína de IgA murina. A confirmação da recombinação de homologos foi fornecida por uma análise de trans

ferência da mancha de DNA em que se identificou um novo rearranjo de um fragmento de restrição. Este fragmento tinha a dimensão esperada (um fragmento de 10,5 kb Bam HI) e continha as sequências de gama globulina 1 humana e as sequências J_{H2} - J_{H3} de murganho. A posterior confirmação foi obtida pela análise de manchas de Western das proteínas sobrenadantes que demonstraram uma cadeia de proteína com cerca de 50 quilodalton (50 kd) procurando determinantes serológicos de IgG humana presentes no sobrenadante de cultura de transfectoma.

O reagente de anti-IgG humana não reagiu com IgA murina o que também se distinguiu mediante a mobilidade electroforética mais lenta.

Os resultados por ELISA também revelaram a presença de IgA murina em muitos sobrenadantes de transfectoma. Isto constitui o resultado da integração do gene de cadeia pesada de J558 funcional intacto, isto é, sem ter sido submetido a recombinação de homologos. Pela comparação da taxa de produção e expressão de IgG humana e de produção e expressão de IgA de murganho, avaliou-se a frequência de recombinações de não homologos em relação com homologos numa quantidade entre 30% a 80%, dependendo da experiência.

Os resultados anteriormente apresentados demonstraram de uma maneira conclusiva que: (a) o plasmídeo alvo funciona como projectado; e (b) que as células de mieloma foram muito eficazes na sua capacidade para induzirem a recombinação de homologos.

As sequências homologas às regiões a montante e/ou

a jusante dos segmentos da região variável podem ser utilizadas na conjugação com segmentos do gene de região variável ou suas fracções para alterar a afinidade e/ou especificidade do antígeno.

Além disso, o sistema J558 descrito anteriormente pode ser utilizado como processo de sondagem para identificar a recombinação que reforça as proteínas.

7. EXEMPLO: PRODUÇÃO DA CADEIA PESADA DE IMUNOGLOBULINA QUIMERICA COM ESPECIFICIDADE PARA ANTIGENIOS L20 ASSOCIADOS A TUMOR HUMANO

As experiências a seguir descritas demonstraram que as células de hibridoma murino podem ser eficientemente induzidas para recombinação de homologos e que esta capacidade pode ser explorada para dirigir as reconstruções principais dos locus de cadeia pesada de imunoglobulina endogena. Construiu-se um plasmídio que continha os exões da região estável de IgG 1 humana flanqueadas pelo intensificador de cadeia pesada murina e o gene de neomicina. Esta estrutura foi utilizada para orientar a produção de IgG de cadeia pesada quimérica de antígeno específico, alcançando o sítio específico para locus de cadeia pesada endogena da linha de células de hibridoma L20 que produz um anti-corpo monoclonal específico para um antígeno associado com um tumor humano (pedido de patente de invenção Nº 834 172 requerido em 26 de Fevereiro de 1986 e referências aqui incorporadas). A frequência do alcance do alvo observou-se ser da ordem de 1 em 20 ou 0,5% de células de hibridoma que integraram o plasmídio.

7.1. CONSTRUÇÃO DE VECTOR ALVO E TRANS FECCÃO DE HIBRIDOMA L20

Construiu-se um vector plasmídico que continha os exões da região estável de IgG1 humana (Cg1) flanqueada pelo intensificador de cadeia pesada murino (MHE), e gene de resistência à neomicina (NEO) (Figura 3). O plasmídio foi linearizado com um sítio Xba I único na região de 2,2 kb da identidade de sequência partilhada com o locus de IgH murina, e transfectou-se para a linha de células de hibridoma L20 que produz um anti-corpo de IgG1 murina específico para um antigénio expresso principalmente nas células de carcinoma humano como se segue: O vector descrito na Figura 3 foi linearizado no sítio único Xba I e utilizadas 50 µg para transfectar 8×10^6 células de hibridoma L20 por electroporação, como anteriormente descrito na secção de materiais e métodos. Colocaram-se em placas as células viáveis com uma densidade de 1×10^4 (ou 1×10^3 de acordo com o cálculo da frequência) células por cavidade em placas de 96 cavidades em meio IMDM com 10% FBS contendo 2,5 mg/ml de G418. As placas foram alimentadas todos os 2 ou 3 dias e após 2 semanas sondaram-se todas as cavidades para a produção de IgG1 humana utilizando-se as técnicas padrão de ELISA. Como reagente de captura, utilizou-se anti-IgG humana desenvolvida em cabra (Cat. Nº 4132 Antibodies Inc., Davis CA) com uma diluição a 1:10 000 e anti-IgG humana desenvolvida em cabra/HRP (Cat. Nº HAP009 American Qualex, La Mirada CA) com uma diluição a 1:6000 destinada à detecção. Todos os sobrenadantes positivos fo-

ram verificados igualmente por sub-sequentes ensaios de ELISA.

Uma vez que os exões de IgG1 humana não estavam associadas com o segmento do gene da região variável, a produção de proteína de cadeia pesada de IgG1 humana podia ocorrer apenas por recombinação do plasmídio com um promotor funcional, codão de iniciação, e excisão e reparação de sequências. Portanto, a selecção de células sobreviventes em meio contendo G418 (isto é, todas as que integraram de um modo satisfatório o plasmídio) foram verificadas para a produção de IgG1 humana pelo método de ELISA (Quadro I).

QUADRO I

FREQUÊNCIA DE INTEGRAÇÕES RESULTANTES NA PRODUÇÃO DE IgG1 HUMANA

<u>INTS POR</u>	<u>CAVIDADES</u>	<u>TOTAL DE</u>	<u>CAVIDADES/</u>	
<u>CAVIDADE</u>	<u>SONDADAS</u>	<u>INTS.</u>	<u>IgG1 HU</u>	<u>FREQ</u>
2,2	480	1056	8	0,75%

A frequência de transfecção foi determinada por colocação em placas a baixa densidade e determinou-se que a sequência de integração que resultou na produção de IgG1 humana era de 1 em 132 ou 0,75%. Experiências mais recentes com as mesmas células e plasmídios resultaram na produção de IgG humana com 2 em cada 512 integrações, ou seja, 0,39% - o que sugere que a frequência meta pode estar mais próxima

de 0,5%. É interessante que, mesmo após clonagem, a maior parte das linhas de células produziam ambas as imunoglobulinas, IgG1 humana e murina, ainda que clones isolados produzissem ocasionalmente uma ou outra (Quadro II). As células das cavidades iniciais que produziam IgG1 humana foram colocadas em placas com uma diluição limitante e testados 12 clones de cada uma relativamente à produção de IgG1 humana (huIgG1) (como descrito para o Quadro I) e IgG de murganho. Os ensaios para IgG de murganho (mIgG) foram realizados utilizando-se anti-IgG de murganho desenvolvido em cabra (Cat Nº 1070 Southern Biotech, Birmingham AL) e anti-kapa de murganho desenvolvido em cabra/HRP (Cat Nº OB1141-85 Fisher Biotech, Orangeburg NY) como reagentes de captura e detecção respectivamente. Apresentam-se os resultados no Quadro II. Os números fornecidos representam clones que produzem anti-corpos humanos, murinos ou ambos.

QUADRO II

PRODUÇÃO DE IgG MURINA vs IgG1 HUMANA EM CLONES DE
TRANSFECTANTES L20 PRODUTORES DE IgG1 HUMANA

<u>PRINCIPAL</u>	<u>huIgG1</u>	<u>mIgG</u>	<u>huIgG1/mIgG</u>
7C5	0	0	12
7E6	1	0	11
8D6	0	0	12
8F8	2	2	8
8H12	1	0	11
10G3	0	2	10
9F11	0	1	11
9F12	1	0	11

7.2. CARACTERIZAÇÃO DE CADEIA PESADA DE L20 QUIMÉRICO EXPRESSO

7.2.1. ANÁLISE DE MANCHAS DE WESTERN

A cadeia pesada humana demonstrou ser serológicamente distinta quando se analisaram os sobrenadantes pelas manchas de Western a partir de clones seleccionados como se segue: lavaram-se as culturas da fracção de crescimento da placa e resusponderam-se em meio isento de soro. Após 24 horas recolheram-se os sobrenadantes, dializaram-se com acetato de amónio a 0,1 Molar liofilizado e fez-se de novo a suspensão em 5 mM Tris pH 6,8. As aliquotas destas amostras e a linha de células 20 inicial mais o anti-corpo 2H9 purificado (uma proteína de IgG1 humana) e IgG1 de L20 murina purificada foram desnaturadas por ebulição na presença de β -mercapto-etanol e electroforese por meio de um gradiente de gel de acrilamida numa concentração entre 10% a 20%. O gel foi transferido para papel de nitrocelulose por meio de electroforese. O filtro resultante foi bloqueado com leite em pó magro a 2% em PBS, corado com anti-IgG humana desenvolvida em cabra/HRP (Nº 1050: CALTAG, São Francisco CA) e desenvolvido com 30 mg de 4-cloro-1-naftol (Sigma, St. Louis MO) em solução de cloreto de sódio tamponada com Tris.

7.2.2. ANÁLISE CITOMÉTRICA ("FLOW CITOMETRIC ANALYSIS")

Por análise citométrica ("flow citometric") as imuno-

globulinas l humana e murina demonstraram especificidade antigénica (Quadro III) do seguinte modo: As amostras utilizadas para as manchas de Western foram analisadas por ELISA para determinar a concentração de IgG1 humana e murina. As diluições foram feitas para se ajustarem as concentrações em $\mu\text{g/ml}$ às fornecidas pela análise citométrica. Incubaram-se 5×10^5 células das linhas 2981 ou 3347 de tumor humano (Hellstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7059-7063, 1986) na presença de anti-corpos L20 referidos (ou meio) durante 30 minutos à temperatura de 4°C , lavados duas vezes e corados com uma diluição a 1:50 (no meio) de qualquer das anti-IgG desenvolvida na cabra humana/FITC (isotiocianato de fluoresceína) (CALTAG, São Francisco CA) ou anti-IgG de murganho desenvolvido em cabra/FITC (Tago, Burlingame CA - cadeia leve e cadeia pesada específicas) durante 30 minutos à temperatura de 4°C . Estas preparações foram em seguida lavadas duas vezes, feita de novo a suspensão e analisadas por citometria para determinar a fluorescência relativa.

Os resultados representam-se no Quadro III. Os valores fornecidos são em equivalência na fluorescência linear para cada preparação (LFE).

QUADRO III

ESPECIFICIDADE ANTIGÊNICA DE ANTI-CORPOS
MURINOS E ANTI-CORPOS L20 QUIMÉRICOS DE
CADEIA PESADA

<u>CLONE</u>	<u>Ab conc</u>		<u>LFE</u>	
	<u>huIgG</u>	<u>mIgG</u>	<u>2981 Alvo</u>	
			<u>α-hu</u>	<u>α-m</u>
7E6-10	1,0	0	35	6
8H12-8	1,0	0	38	7
8F8-8	1,0	0,5	39	11
9H12-1	1,0	0,1	42	7
8F8-10	0	0,4	2	10
10G3-5	0	1,0	2	31
mL20	0	1,0	2	18
meio	0	0	2	2
<u>3347 Alvo</u>				
			<u>α-hu</u>	<u>α-m</u>
7E6-10	0,4	0	7	3
mL20	0	0,4	2	3
meio	0	0	2	2

Portanto, a linha de células L20 principal muito provavelmente retém duas cópias dos alelos de cadeia pesada produtivos, apenas uma das quais se submete a uma recombinação específica com uma dada célula. Determinou-se que os níveis de produção para os clones que exprimem apenas o anti-corpo quimérico eram na ordem de 5-10 µg/ml em 10 ml de sobrenadantes de cultura na fase de desenvolvimento em placa.

7.2.3. ANALISE POR MANCHAS DE SOUTHERN

A análise por manchas de Southern utilizando uma sonda específica para CI γ 1 humana demonstrou a integração de fragmentos específicos em comum, entre as linhas de células que produzem IgG1 humana com três enzimas diferentes. Mapeou-se um sítio Bam HI com 1,4 kb a montante da sequência alvo numa linha de células principal L20, portanto, espera-se que uma inserção do vector de recombinação no sítio alvo produza um fragmento Bam HI de 5,5 kb o qual hibridava com uma sonda huC γ 1. Este fragmento foi observado em cada clone produtor de IgG1 humana.

7.2.4. ANALISE DE ADCC

O anti-corpo de IgG1 L20 murina foi comparado com a proteína que incorpora a cadeia pesada quimérica para determinação da actividade mediante um ensaio de ADCC (Hellstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1499-1502, 1985). Como se pode verificar através dos resultados representados no Quadro IV a alteração das regiões estáveis de cadeia pesada para as de IgG1 humana proporcionou uma nova função efectora para esta especificidade.

45

QUADRO IV

ADCC DE CÉLULAS ALVO 2981 INDUZIDAS POR MAb
L2O MURINA E L2O DE CADEIA PESADA QUIMÉRICA

<u>Imunoglobulina</u>	<u>Conc. (µg/ml)</u>	<u>ADCC 2981 Alvo Células</u>
L2O 8F8-8	4	58%
L2O 7E6-10	8	53%
MAb L2O	10	31% -
None*	0	31%

* Apenas células efectoras (linfocitos)

7.3. PRODUÇÃO DE CADEIA PESADA DE L2O QUIMÉRICO POR MEIO DE UM VECTOR ALVO DIFERENTE

Noutros exemplos utilizou-se outro plasmídeo descrito na Figura 4A para introduzir exões de C γ 1 humana em L2O de células de hibridoma murinas produzindo proteínas de cadeia pesada quimérica de IgG1 humana. O plasmídeo 4A foi transfectado para a linha de células de hibridoma L2O resultando na produção de huIgG de 4 cavidades de acordo com o ensaio por ELISA de aproximadamente 700 integrações.

8. CONSTRUÇÃO DE CADEIAS PESADAS DE G28.1 QUIMÉRICO

Noutro exemplo utilizou-se o plasmídeo representado na Figura 3 para converter a linha de células de hibridoma

46-

murina G28.1 (Ledbetter et al., Leukocyte typing III, A. J. McMichael, ed., Oxford Univ. Press pp.339-340, 1987) para a produção, pelo mesmo método da cadeia pesada de IgG humana de antígeno específico. Numa única experiência de 864 integrações resultaram 4 produtores de huIgG1. Estas linhas de células foram identificadas por ELISA, verificadas e em seguida determinada a sua capacidade de ligação a células B tonsilares do seguinte modo: incubaram-se células B tonsilares com sobrenadante proveniente da linha de células referida (ou meio), lavaram-se e contaram-se por coloração com anti-IgG humano desenvolvido em cabra (α hu) ou anti-IgG de murganho desenvolvido em cabra (α m) como descrito anteriormente e analisaram-se por citometria ("flow cytometry". Os resultados estão representados no Quadro V. Os sobrenadantes foram quantificados por ELISA para IgG humana e murina e os valores estão referidos em ng/ml. Os dados da fluorescência estão expressos sob a forma de equivalentes de fluorescência linear.

QUADRO V
ESPECIFICIDADE ANTIGÊNICA DE SOBRENADANTES DE
CADEIA PESADA QUIMÉRICA G28.1

<u>LINHA DE CÉLULAS</u>	<u>huIgG</u>	<u>mIgG</u>	<u>LFE</u> <u>α-hu</u>
11F10	0	87	9
1F11	97	89	93
4F5	86	91	38
3D2	90	86	77
3D11	56	85	16
meio	0	0	9
<u>G28.1</u>	0	83	<u>α-m</u> 53
meio	0	0	3

Mais uma vez os resultados demonstraram a preservação da especificidade antigénica para moléculas de anti-corpo incorporando uma cadeia pesada quimérica de IgG1 humana.

9. CONSTRUÇÃO DE CADEIAS PESADAS QUIMÉRICOS DE L6

O plasmídeo alvo recombinante representado na Figura 4B foi transfectado para a linha de células de hibridoma murino L6 resultando numa única linha de células que deu origem a clones que produziam estávelmente a cadeia pesada quimérica (na ausência da cadeia pesada murina). Os anti-corpos mostraram ligar-se a células tumorais humanas e induzirem a destruição via ADCC com células efectoras humanas de um modo mais eficaz do que a L6 murina (Quadro IV), comparativamente à cadeia quimérica leve ou pesada L6 produzida por técnicas de recombinação convencionais (pedido de patente de invenção Nº 684 759, requerido em 21 de Dezembro de 1984 e pedido de patente de invenção Nº 776 321, requerido em 18 de Outubro de 1985 e referências aqui incorporadas).

QUADRO VI

ADCC DE CÉLULAS ALVO 2981 INDUZIDAS POR MAb
L6 MURINA E CADEIA L6 PESADA QUIMÉRICA

<u>Imunoglobulina</u>	<u>Conc. (µg/ml)</u>	<u>ADCC de Células Alvo 3347</u>
L6 7B7.16	0,01	83%
L6 7B7.7	0,01	82,5%
MAb L6	0,01	58%
Nenhuma*	0,01	53%

* Apenas células efectoras (linfocitos)

Manchas de Southern confirmaram a presença de um fragmento com 10 kb Ava I, e de um fragmento com 8 kb Bgl II, que hibridaram com uma sonda huCgl. Estes fragmentos eram consistentes com a inserção do vector plasmídico no sítio alvo baseado na mapeação prévia do segmento do gene da região variável de cadeia pesada de L6 genómico clonado.

A presente invenção não é limitada no seu âmbito pelos aspectos descritos nos exemplos que têm que ser entendidos apenas como simples esclarecimentos de aspectos diferentes desta invenção e quaisquer métodos que sejam funcionalmente equivalentes estão incluídos no seu âmbito. Evidentemente, que diversas modificações da presente invenção além daquelas mostradas e descritas aqui são de um modo evidente familiares para os técnicos a partir da descrição anterior. Estas modificações entendem-se que são abrangidas pelo âmbito das reivindicações apenas.

Reivindicações

1.- Processo para a produção de moléculas de anticorpos quiméricos, caracterizado pelo facto:

- a) de se submeter a transfecção uma linha de células produtora de anticorpos com um vector alvo que incorpora: .
 - i) um gene de substituição para modificar a sequência que codifica uma fracção do anticorpo produzido pela linha de células; e
 - ii) uma sequência alvo homóloga de uma segunda sequência de DNA adjacente à sequência de anticorpos que se pretende modificar;

de tal modo que o gene de substituição modifica a sequência do anticorpo via recombinação in vivo de homólogos de sítio específico; e

- b) de se escolher um transfectante que produz a molécula de

anticorpo quimérico.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se modificar a sequência do anticorpo que incorpora o gene da região estável, ou uma sua fracção.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o gene de substituição codificar uma segunda região estável do anticorpo, ou uma sua fracção.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o gene de substituição codificar um enzima, toxina, hormona, factor de crescimento ou adaptador.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a sequência de anticorpo a ser modificada abranger o gene de região variável, ou uma sua fracção.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o gene de substituição codificar uma segunda região variável de anticorpo, ou uma sua fracção.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a sequência de anticorpo a ser modificada

abranger um gene de cadeia pesada.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de a sequência alvo ser homóloga de regiões V, D, J, ou região de desvio ou adjacentes de introes do gene de cadeia pesada que se pretende modificar.

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a sequência de anticorpo a ser modificada incorporar o gene de cadeia leve.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo facto de a sequência alvo ser homóloga das regiões V, D ou J ou adjacente de intrões do gene de cadeia leve que se pretende modificar.

11.- Processo para a produção de moléculas de anticorpos quiméricos, caracterizado pelo facto:

a) de se cultivar uma linha de células produtora de anticorpos quiméricos obtida mediante transfecção de uma linha de células produtora de anticorpos com um vector alvo constituído por:

i) um gene de substituição para modificar uma sequência que codifica uma fracção do anticorpo produzido por a linha de células; e

ii) uma sequência alvo homóloga de uma segunda sequência de DNA adjacente à sequência de anticorpo a ser modificada;

de tal modo que o gene de substituição modifica a sequência do anticorpo via recombinação de homólogos de sítio específico in vivo e o anticorpo quimérico é expresso

pela linha de células transfectada; e

(b) de se isolar a molécula do anticorpo quimérico do meio de cultura.

12.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 11, caracterizado pelo facto de a molécula de anticorpo quimérico incorporar uma região variável de origem murina e uma região estável de origem humana.

13.- Processo de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 ou 11, caracterizado pelo facto de a molécula de anticorpo quimérico incorporar uma região variável ligada a um enzima, toxina, hormona, factor de crescimento ou adaptador.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos a ser submetida a transfecção produzir anticorpos monoclonais L6.

15.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracte-

rizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos a ser submetida a transfecção produzir anticorpos monoclonais L6.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos compreender HB 8677 tal como depositada na ATCC.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos compreender HB 8677 tal como depositada na ATCC.

18.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos a ser submetida a transfecção produzir anticorpos monoclonais L20.

19.- Processo de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos compreender HB 8913 tal como depositada na ATCC.

20.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos a ser submetida a transfecção produzir anticorpos monoclonais L20.

21.- Processo de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de a linha de células produtora de anticorpos compreender HB 8913 tal como depositada na ATCC.

Lisboa, 26 de Outubro de 1988
O Agente Oficial da Propriedade Industrial

Amílcar

R E S U M O

"Processo para a produção de anticorpos quiméricos mediante
recombinação de homólogos"

Descreve-se um processo para a produção de anticorpos quiméricos utilizando novos vectores de DNA recombinante e recombinação de homólogos in vivo.

As instruções de DNA recombinante da presente invenção podem ser utilizadas para submeter a transfecção células produtoras de anticorpos, de tal modo que a recombinação de homólogos alvejados ocorre nas células transfectadas que conduzem à modificação de genes e à produção de moléculas de anticorpos quiméricos pelas células transfectadas.

Lisboa, 26 de Outubro de 1988

Agente Oficial da Propriedade Industrial

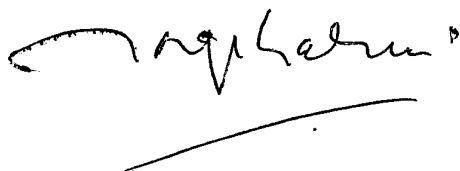


FIG. 1

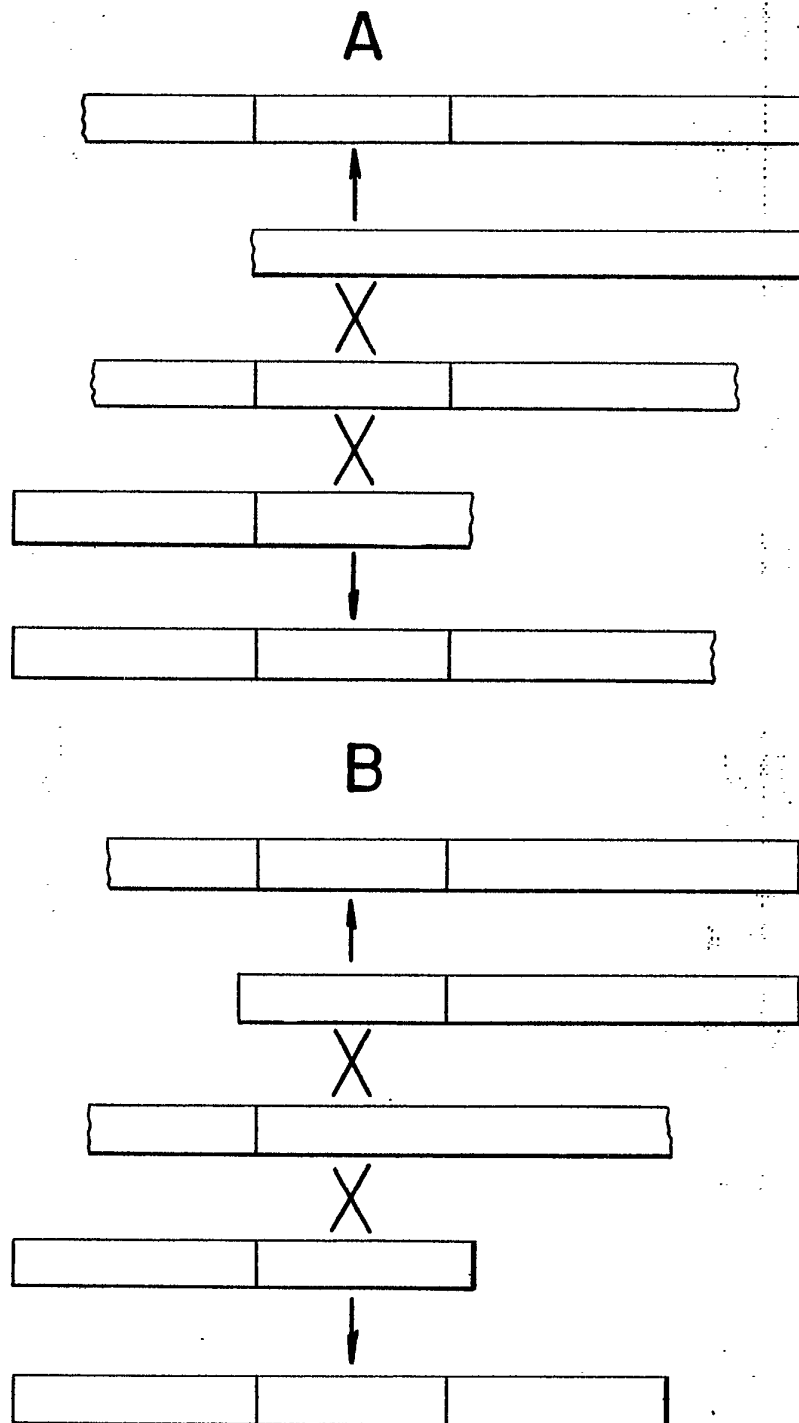


FIG. 1()

C

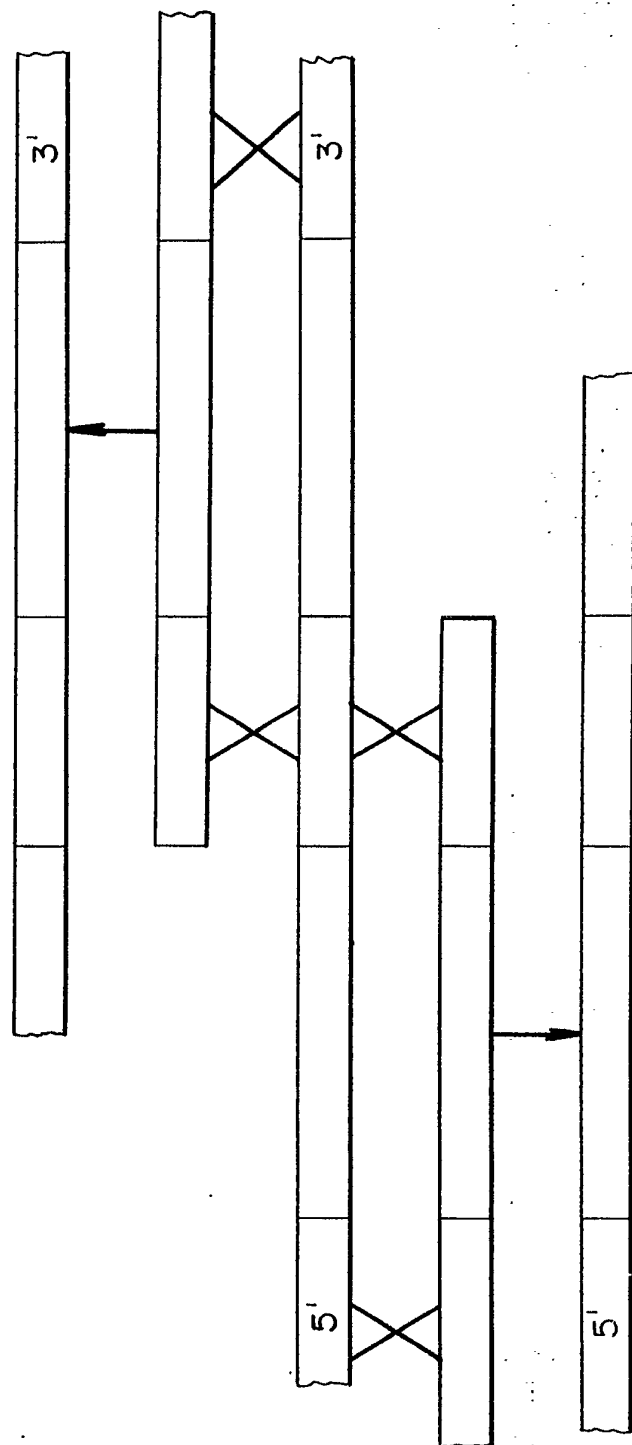


FIG. 2

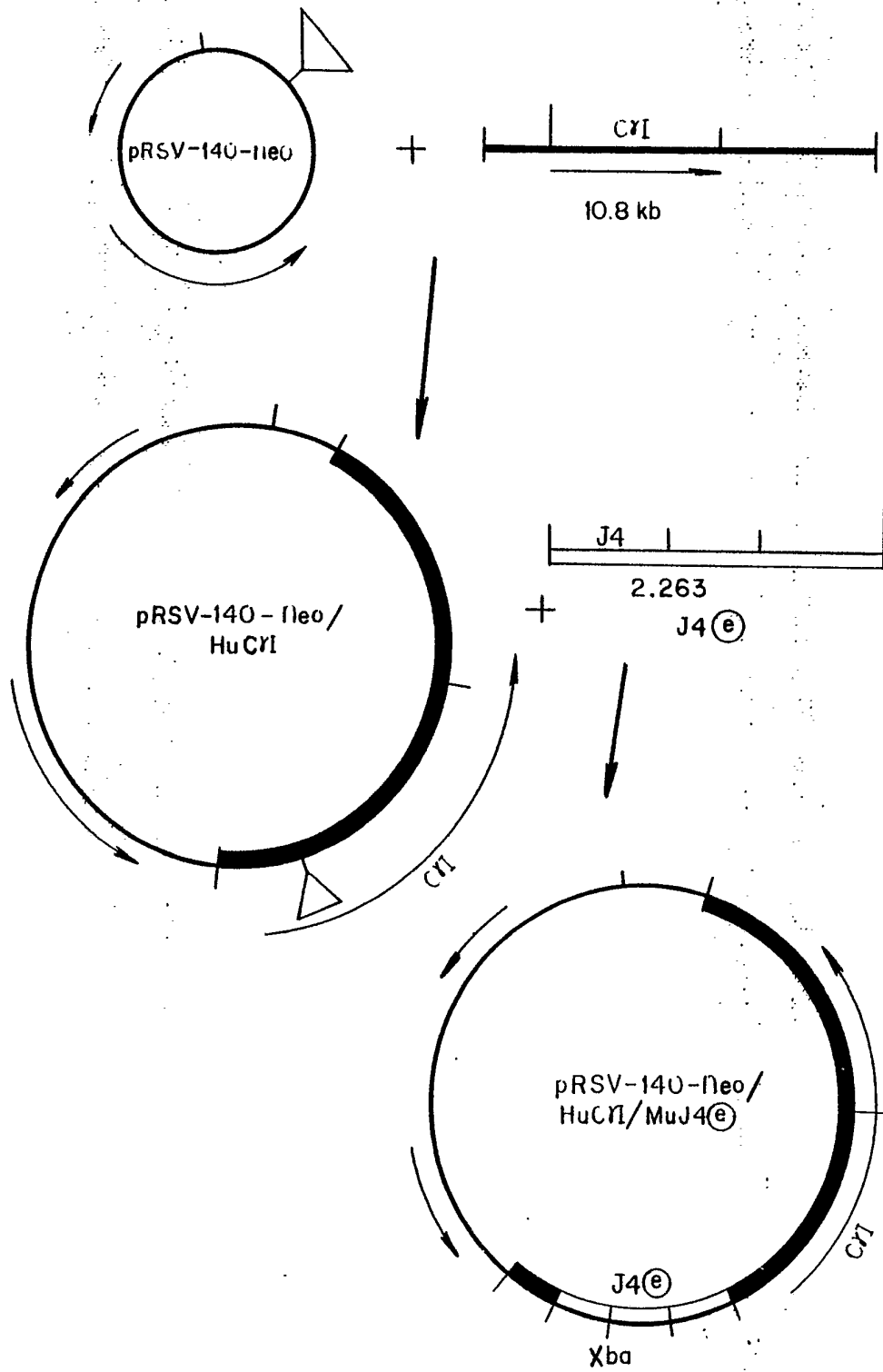


FIG. 3

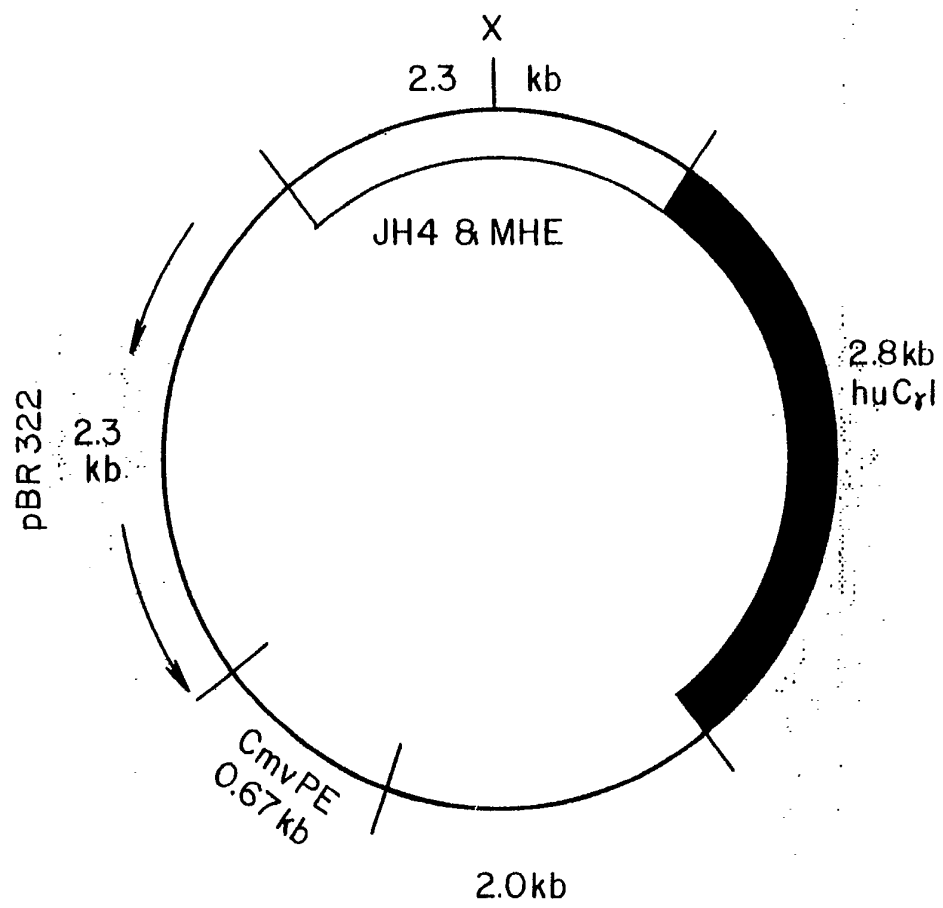


FIG. 4A

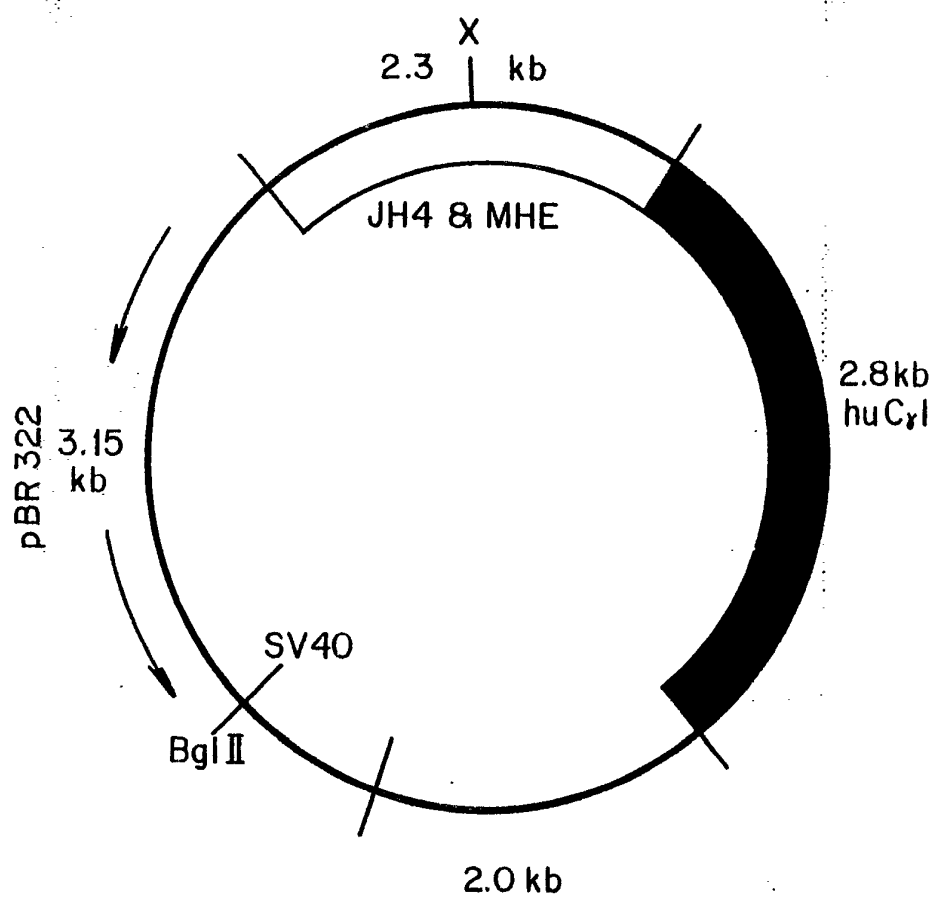


FIG. 4B

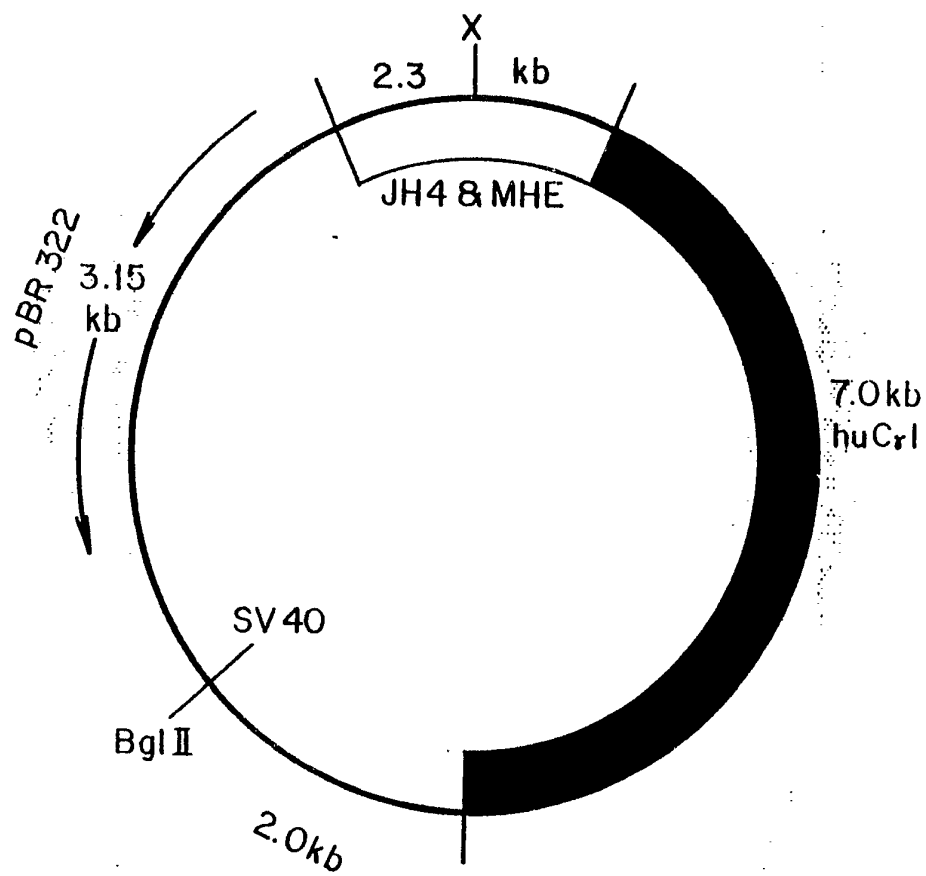
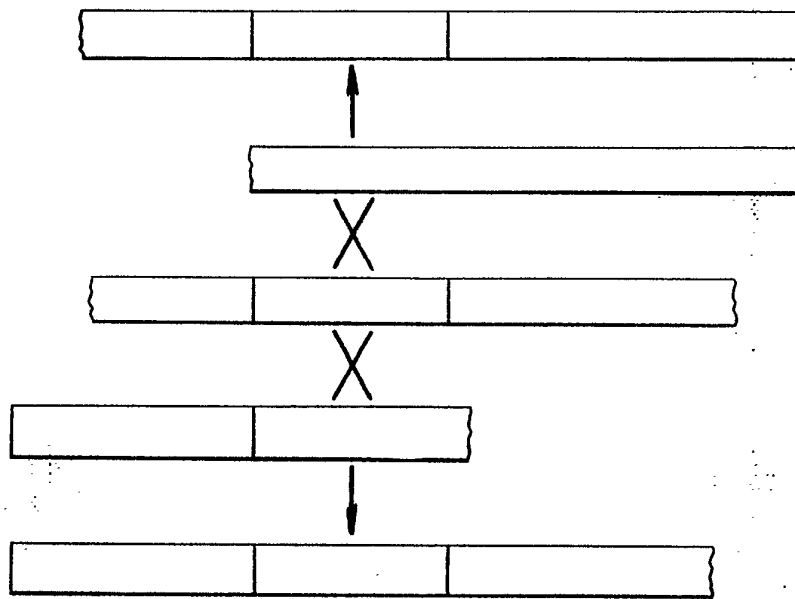


FIG. 1

A



B

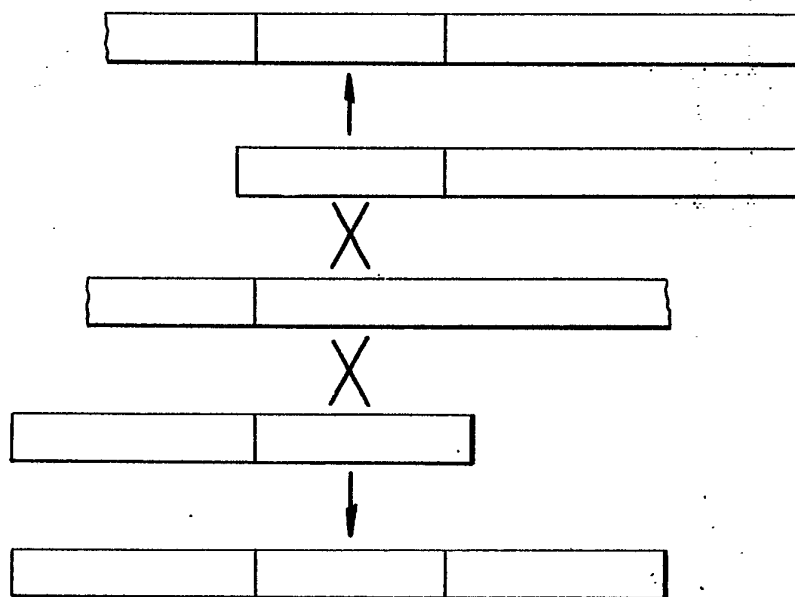


FIG. 1()

C

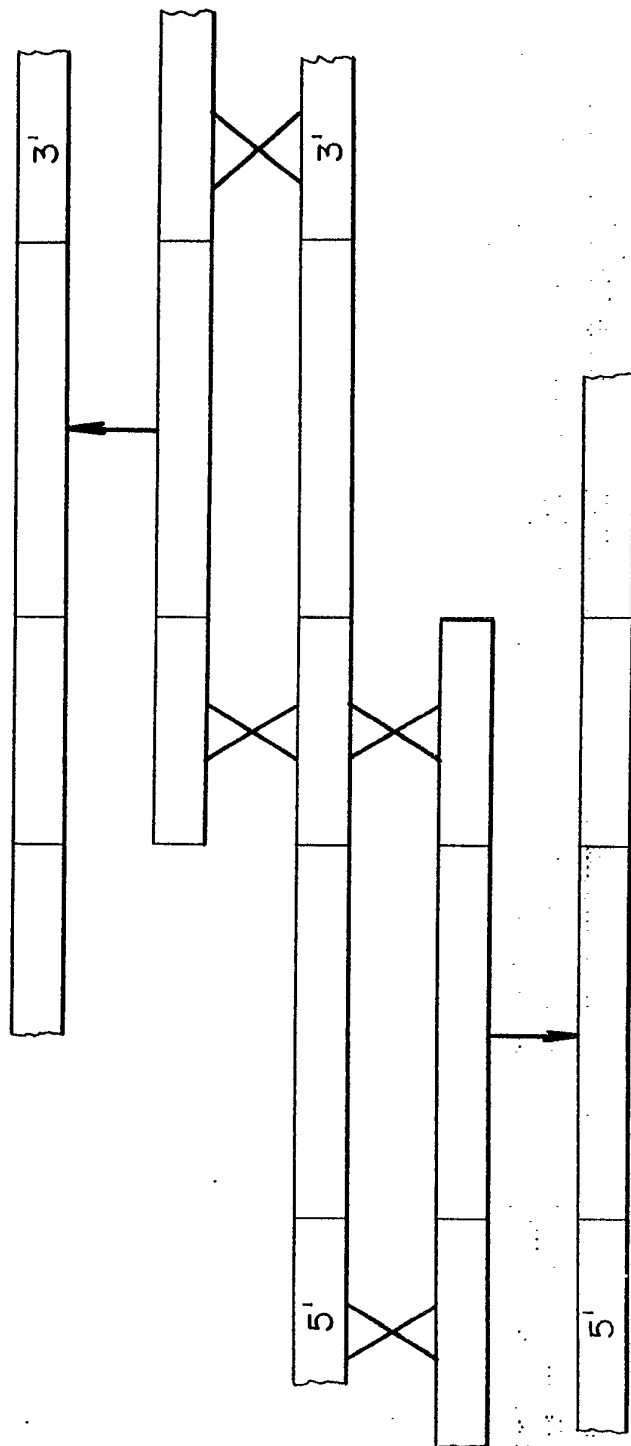


FIG. 2

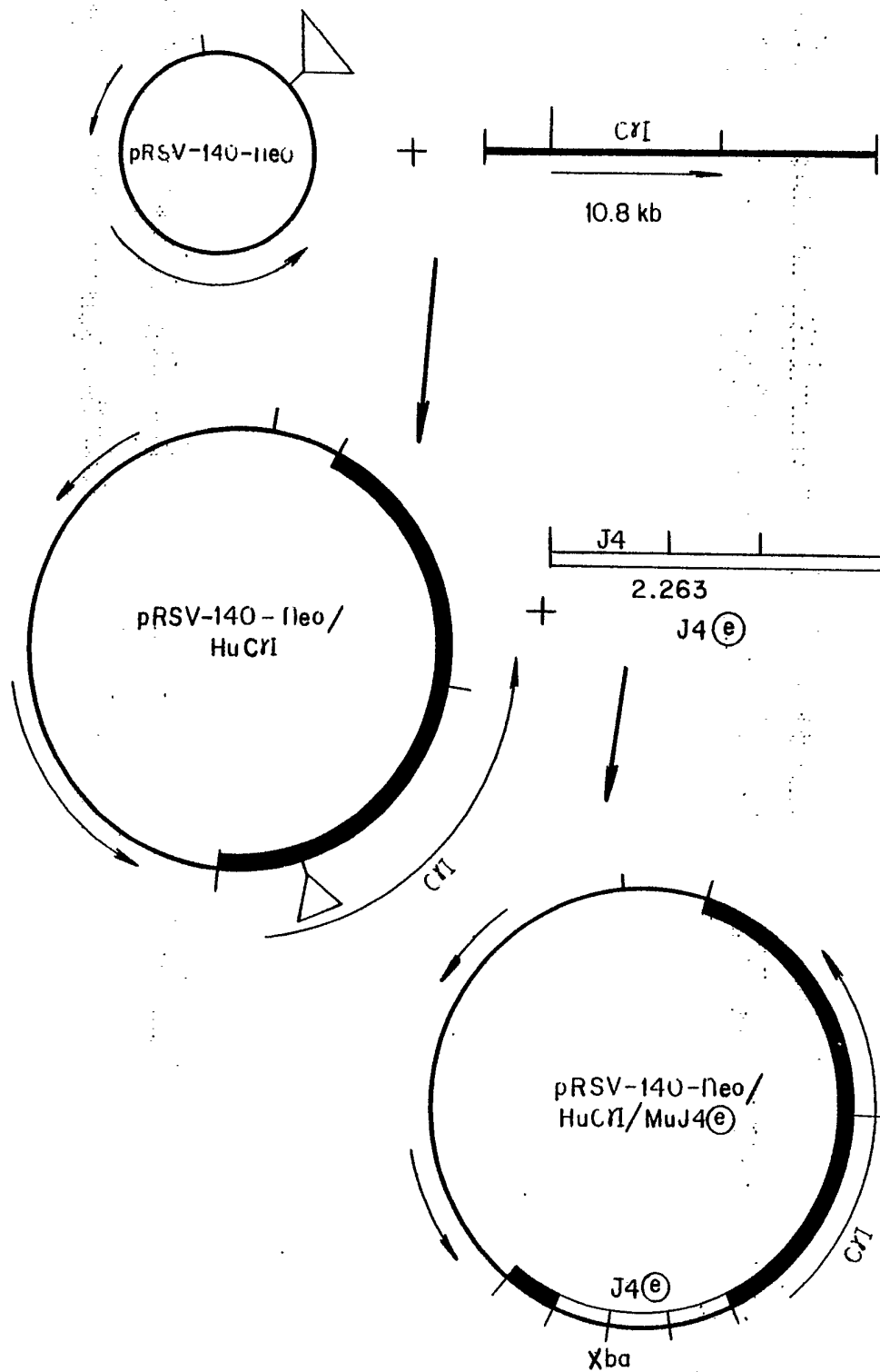


FIG. 3

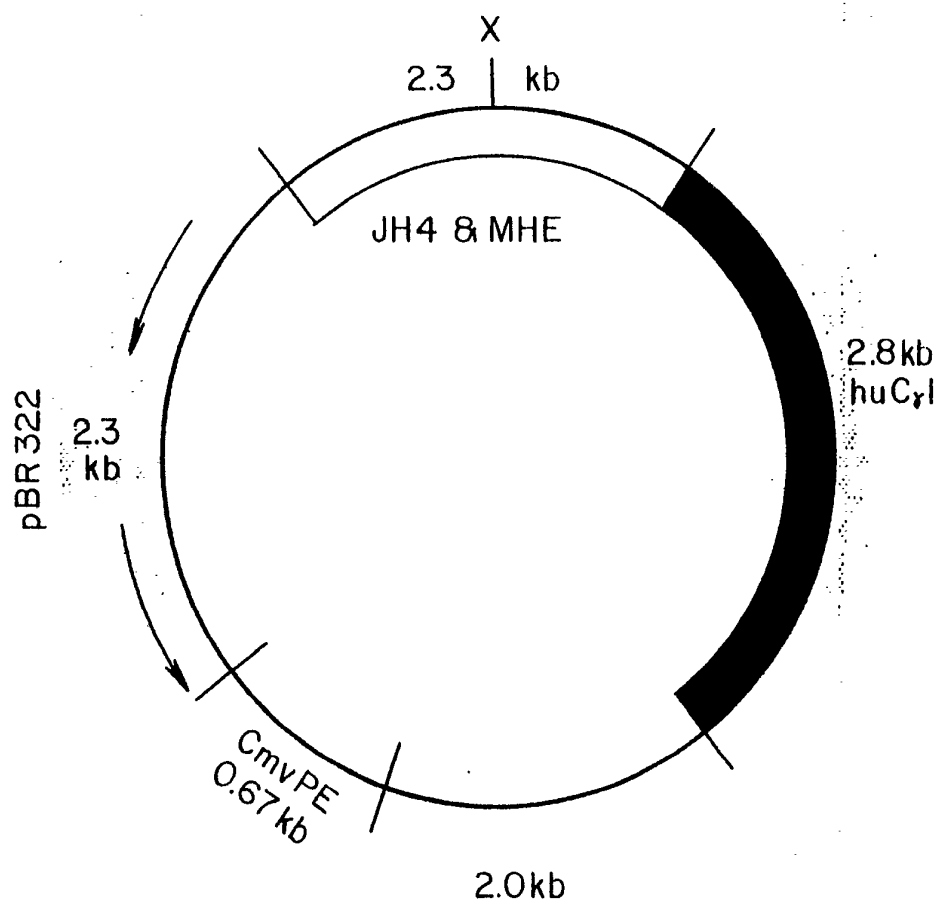


FIG. 4A

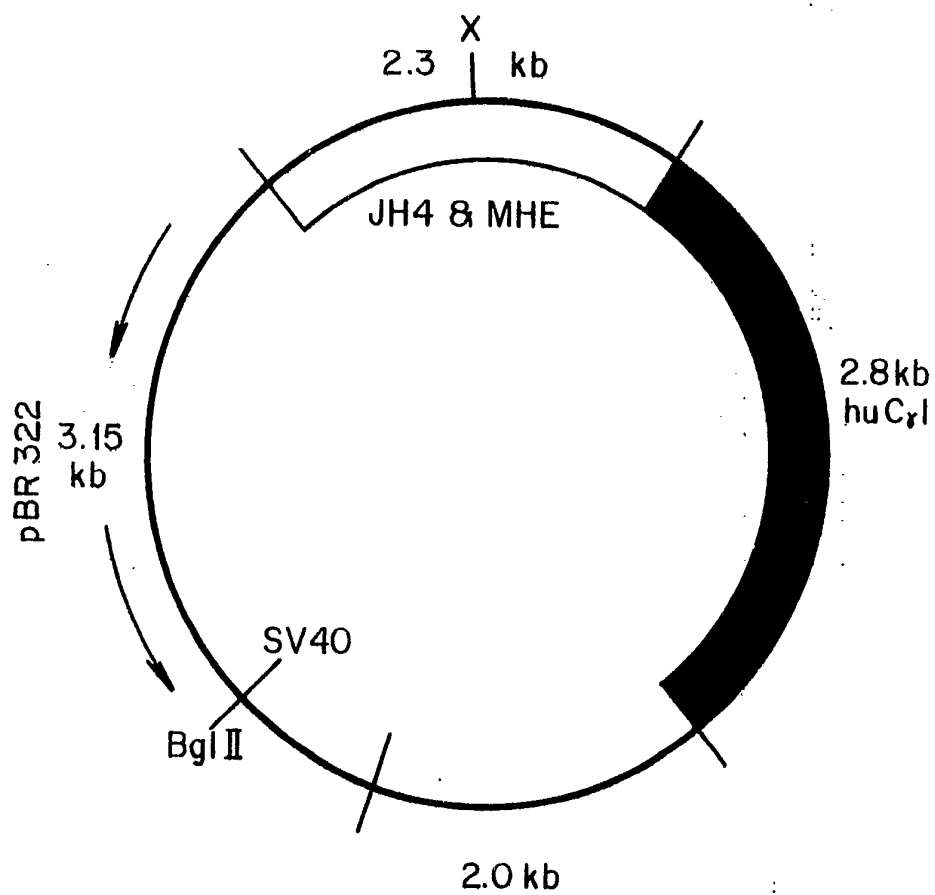
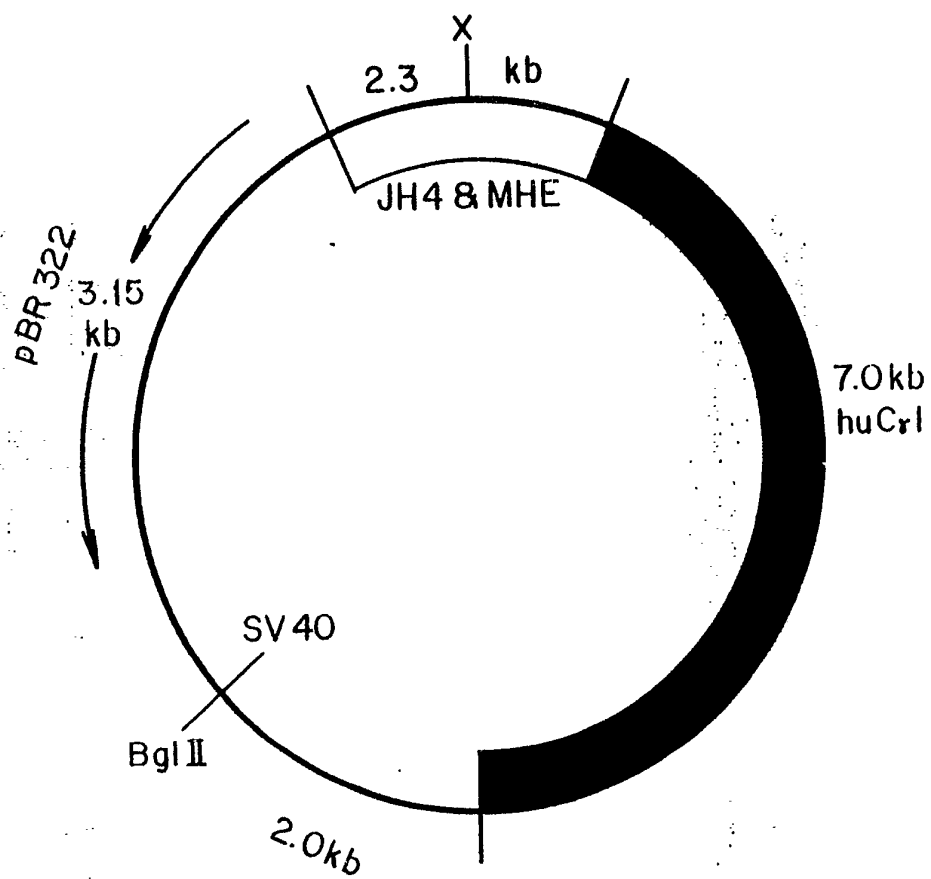


FIG. 4B



88 838

7

