

(11) Número de Publicação: **PT 1519748 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/44 (2007.10) **A61K 9/50** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2003.05.30**

(30) Prioridade(s): **2002.07.04 DE 10230223**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.04.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.09.16**
248/2009

(73) Titular(es):

THERAMAB LLC.

**8, STR.1 NAUCHNY PROEZD RU-117246,
MOSCOVO**

RU

(72) Inventor(es):

THOMAS HÜNIG

DE

(74) Mandatário:

**ELSA MARIA MARTINS BARREIROS AMARAL CANHÃO
RUA DO PATROCÍNIO 94 1399-019 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **MICROPARTÍCULAS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS DE CD28**

(57) Resumo:

DESCRIÇÃO

"MICROPARTÍCULAS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS DE CD28"

Campo da Invenção

A invenção refere-se a micropartículas com uma estrutura de suporte, bem como a anticorpos monoclonais (mAb) ligados à estrutura de suporte, utilizações de tais anticorpos bem como um processo para a preparação de tais micropartículas.

Base da invenção e estado da técnica

Existem diferentes doenças de organismos de sangue quente, humanos ou animais, em que o número de células sanguíneas de diferentes tipos é reduzido ou insuficientemente activo relativamente ao estado saudável.

Um primeiro grupo deste tipo de doenças é um número patologicamente reduzido de células T, em especial o conjunto do número de células T CD4, como por exemplo no caso de SIDA ou doenças associadas à leucemia na sequência de quimioterapia ou terapia por radiação.

Um segundo grupo de doenças, no qual o número ou a actividade de um determinado subgrupo de células T, que nas pessoas saudáveis mantêm ajustada a tolerância imunológica, é reduzido ou é perturbado na sua função, compreende doenças autoimunes-inflamatórias. São exemplos a artrite reumatóide,

doenças intestinais inflamatórias, diabetes requerendo tratamento por insulina, esclerose múltipla bem como o síndrome Guillian-Barré.

Um terceiro grupo de doenças é designado granulocitopenia (por exemplo, neutropenia) ou monocitopenia e refere-se aos granulócitos. Como causas para esta doença sugerem-se: i) granulocitopoiese reduzida ou monocitopoiese (perturbação aplásica) devido a danos na medula óssea, por exemplo, através de agentes químicos, como benzeno, medicamentos, como citostáticos, imunossupressivos, AZT e/ou cloranfenicol (em função da dose, tóxicos), ou como fenilbutazona, compostos de ouro, raramente cloranfenicol (através de reacções farmacocinéticas independentemente da dose), radiações ou autoanticorpos contra células-mãe (em alguns casos de imunoneutropenia), devido a infiltração da medula óssea (leucemias, carcinomas, linfomas malignos) e/ou devido a osteomielo esclerose, ii) perturbações de maturação da granulocitopoiese, por exemplo, através de perturbações de maturação congénitas da mielopoiese, síndrome de Kostmann (paragem da maturação da mielopoiese no estágio do promielócito), neutropenia cíclica, síndrome de mielodisplasia, deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico com granulopoiese, eritropoiese e/ou trombopoiese ineficaz. As terapias habituais compreendem a administração de factores de crescimento da granulocitopoiese (por exemplo, G-CSF e GM-CSF).

Um quarto grupo é designado trombocitopenia. Como causas sugerem-se: i) trombocitopoiese reduzida na medula óssea (perturbação aplásica ou número reduzido de megacariócitos na medula óssea) devido a danos na medula óssea, por exemplo, através de agentes químicos, como benzeno, medicamentos, como

citostáticos e/ou imunossupressivos, radiação ou infecções, como por exemplo, HIV, ou autoanticorpos contra megacariócitos (em alguns casos de imunotrombocitopenia), devido a infiltração na medula óssea (leucemias, carcinomas, linfomas malignos) e/ou devido a osteomieloesclerose, ii) perturbações de maturação dos megacariócitos (megacariócitos na medula óssea normais ou elevados) com trombopoiese, eritropoiese e/ou granulopoiese ineficaz com megaloblastos, bastonetes gigantes entre outras, devido a deficiência em vitamina B12 ou ácido fólico. As terapias habituais compreendem a omissão de medicamentos suspeitos, substituição de trombócitos (em perturbações na formação da medula óssea: trombopoetina) bem como MGDF (estimulação da proliferação e maturação de megacariócitos).

Um quinto grupo formam as anemias aplásicas ou insuficiência da medula óssea com aplasia/hipoplasia da medula óssea e pancitopenia (doença das células-mãe). Uma anemia aplásica congénita é, por exemplo, a anemia de Fanconi. São mais frequentes as anemias aplásicas adquiridas, como anemia aplásica idiopática (causa desconhecida) e anemias aplásicas secundárias através de medicamentos, agentes tóxicos, radiação ionizante e infecções virais (ver acima). Acções terapêuticas de apoio compreendem a substituição de eritrócitos/trombócitos. Acções terapêuticas causais compreendem a transplantação da medula óssea ou transplantação de células-mãe, terapias imunossupressivas (por exemplo, ATG) e outras medidas terapêuticas, como a administração de citoquinas (GM-CSF, G-CSF, MGDF e/ou trombopoetina).

Finalmente, a acompanhar a leucemia aguda, ocorre frequentemente, anemia, trombocitopenia e/ou granulocitopenia. As terapias compreendem a substituição de eritrócitos e

trombócitos de acordo com a necessidade ou a excitação da granulopoiese através de G-CSF e/ou GM-CSF, a quimioterapia e a transplantação da medula óssea e/ou transplantação de células-mãe.

É comum às doenças acima do primeiro e segundo grupo que as respectivas células sanguíneas são tais que possuem à sua superfície CD28. É comum a grupo três até seis que as células sanguíneas em causa sejam tais que não possuem, em contrapartida, à sua superfície qualquer CD28.

Para melhor compreender a invenção é importante, além disso, o seguinte conhecimento base. A activação de células T em repouso para a proliferação e diferenciação funcional necessita, em primeiro lugar, da ocupação de duas estruturas superficiais, designadas receptores: 1. do receptor do antigénio que apresenta uma especificidade diferente de célula para célula, e que é necessária para o reconhecimento de antigénios, por exemplo, produtos de fissão viral; bem como da molécula de CD28 expressa igualmente em todas as células T em repouso com a excepção de um subgrupo de células T CD28 de seres humanos, a qual se liga naturalmente a ligandos sobre a superfície de outras células do sistema imunitário. Fala-se da co-estimulação da imunorreacção específica para antigénios através de CD28. Na cultura de células estes processos podem ser imitados através da ocupação do receptor de antigénios bem como da molécula de CD28 com mAbs adequados. No sistema clássico da co-estimulação nem a ocupação do receptor de antigénio nem o da molécula de CD28 isoladamente conduzem à proliferação de células T, sendo porém efectiva a ocupação de ambos os receptores. Esta observação foi verificada em células T do ser humano, do ratinho e do rato.

Existem em contrapartida também mAbs específicos de CD28, que isoladamente podem induzir a proliferação de células T. Uma tal activação superagonista, isto é, independentemente da ocupação do receptor do antigénio de linfócitos T em repouso por mAbs específicos de CD28, foi observada nos seguintes sistemas: no documento da literatura Brinkmann *et al.*, *J. Immunology*, 1996, 156: 4100-4106, foi mostrado que uma muito pequena porção (5%) dos linfócitos T humanos, podem ser atribuídos ao grupo dos linfócitos T em repouso, por causa da falta do marcador de superfície CD45 RO, sendo activado pelo mAb 9.3 específico de CD28, normalmente requerendo co-estimulação quando adicionado o factor de crescimento interleucina-2 (IL-2) sem ocupação do receptor do antigénio. No trabalho de Siefken *et al.*, *Cellular Immunology*, 1997, 176: 59-65, foi mostrado que mAb específico de CD28 preparado de forma convencional, isto é, por imunização de ratinhos com células T humanas, pode activar numa cultura de células, um subgrupo de células T humanas sem a ocupação do receptor de antigénio para a proliferação, se CD28 for ocupado por esse mAb e as células ligadas a mAbs forem adicionalmente reticuladas umas com as outras por outros anticorpos. É comum aos anticorpos até agora conhecidos que apenas uma pequena porção das células T possa ser activada.

No trabalho de Tacke *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, 27:239-247, foram descritos dois tipos de anticorpos monoclonais específicos de CD28 com diferentes propriedades funcionais: mAbs co-estimuladores que co-estimulam a activação de células T em repouso com a ocupação simultânea apenas do receptor do antigénio; e mAbs superagonistas que podem activar, sem ocupação do antigénio receptor de linfócitos T de todas as classes, *in vitro*, e no teste animal para a proliferação. Ambos os mAbs até agora conhecidos resultam de uma imunização com células, sobre

os quais é expresso CD28 no rato, e são passíveis de ser obtidos através de diferentes seleções direcionadas no sentido das suas propriedades respectivas descritas. Finalmente, do documento da literatura WO 98/54225, é conhecido um outro mAb superagonista específico de Cd28, designadamente CMY-2.

De forma surpreendente porém, de acordo com o documento da literatura DE-10050935 A1, células sanguíneas não possuindo CD28 podem também ser estimuladas com mAbs superagonistas específicos de Cd28 em aplicação *in vivo*.

Os mAbs superagonistas até agora conhecidos cumprem todas as exigências no que diz respeito ao seu efeito estimulador, sendo porém desejável ser necessário menos mAbs para um efeito estimulador definido. Além disso, a estimulação de linfócitos T por mAbs superagonistas específicos de Cd28 está até agora limitada a dois sistemas, cada um possuindo, respectivamente, desvantagens: os linfócitos T isolados podem frequentemente ser estimulados apenas em cultura de células por tais mAbs, se os discos da cultura tiverem sido previamente revestidos com anticorpos reagindo com os mAbs superagonistas utilizados e secundariamente reticulados. Quando se utilizam preparações não separadas de células sanguíneas periféricas que contêm também linfócitos T bem como em aplicação *in vivo*, os mAbs superagonistas podem também ser utilizados como substância solúvel; a razão para isto é presumivelmente que a reticulação secundária através dos designados receptores Fc ocorre sobre os linfócitos não T que reagem com a porção constante de mAbs superagonistas, a designada porção Fc. Esta dependência dos receptores Fc é problemática, eventualmente, devido à porção variável de células positivas receptoras Fc nas preparações de células sanguíneas periféricas e por causa da variabilidade da

capacidade de ligação dos anticorpos provocada por diferentes alelos receptores Fc. Além disso, é necessária a repetida adição de receptores Fc exprimindo linfócitos não T para a repetida estimulação *in vitro* de linfócitos T por mAbs superagonistas solúveis. Para utilização em seres humanos, isto exige medidas logísticas e segurança adicionais.

É conhecida a multiplicação de células T em cultura utilizando pequenas esferas às quais estão ligados quer mAbs co-estimuladores específicos de CD28 bem como mAbs específicos de TCR (CD3). Aqui, em primeiro lugar, é desvantajoso que sejam necessárias duas substâncias diferentes. Isto exige um esforço considerável quando se prepara sob condições GMP, que são legalmente exigidas para preparações previstas para terapia. Além disso, é desvantajoso que cada uma destas substâncias necessite de ser utilizada numa concentração relativamente elevada, porque devido à imobilização comum, nem todas as moléculas estão disponíveis numa pequena esfera para a ligação necessariamente simultânea às células alvo, não só por razões estéreas.

Problema técnico da invenção

A invenção apresenta por isso como base o problema técnico, de proporcionar meios, com os quais células sanguíneas possam ser estimuladas, em que a quantidade de mAbs necessária seja menor que quando se utiliza os mesmos mAbs em solução, que tornam a estimulação independente da presença ou da qualidade das células não T possuindo receptores Fc, e que podem passar por ser passíveis de ser preparadas de forma mais fácil sob condições GMP.

Base da invenção e exemplos de realização preferidos

De maneira a solucionar este problema técnico, a invenção divulga micropartículas com uma estrutura de suporte em que na estrutura de suporte se encontram ligados exclusivamente anticorpos monoclonais (mAbs) superagonistas específicos de CD28 ou um composto mimetizante destes. De forma surpreendente, é necessária uma menor quantidade de mAbs para um efeito estimulador definido através de tais mAbs imobilizados, ou é conseguido um efeito estimulador mais forte com a mesma quantidade. Isto é, além disso, conseguido sem que seja necessário um sinal de TCR. A ligação de anticorpos específicos de TCR ou outros componentes co-estimuladores à estrutura de suporte não é necessária, sendo desta maneira evitados também problemas estéreos de uma co-estimulação através de substâncias imobilizadas. Numa estimulação *in vitro* de células T são apenas necessários, numa cultura de células (a par do meio), dois componentes, as células T e as micropartículas de acordo com a invenção. Prescinde-se da necessidade para células "de alimentação" ou o revestimento de superfícies plásticas com preparações de anticorpos, que reticulam os mAbs.

Neste contexto é de grande significado como outra vantagem, que para a preparação das micropartículas de acordo com a invenção seja apenas necessário um único anticorpo, o que simplifica substancialmente a preparação sob condições GMP.

Em detalhe, a ligação dos mAbs à estrutura de suporte pode ser conseguida das mais variadas formas. É possível que os mAbs sejam ligados directamente e por forças electrostáticas, forças de van der Waals, interacções hidrofóbicas, de um modo preferido contudo, de forma covalente, à superfície da estrutura de

suporte. Os mAbs podem porém também ser ligados indirectamente à superfície da estrutura de suporte através de um composto espaçador, de um modo preferido, covalentemente ligado à superfície da estrutura de suporte.

Como composto espaçador sugerem-se, em princípio, todas as moléculas orgânicas que por um lado apresentem um grupo que seja reactivo com grupos reactivos da superfície da estrutura de suporte e por outro lado sejam capazes de se ligar a mAbs. Neste caso, a ligação pode ter lugar por forças electrostáticas, forças de van der Waals, interacções hidrofóbicas ou covalentemente. O composto espaçador pode ser seleccionado, em especial, do grupo constituído por “polímeros orgânicos, péptidos, proteínas, imunoglobulinas e combinações de tais substâncias”. O composto espaçador deve ser fisiologicamente aceitável.

Em relação à estrutura de suporte, a sua composição não é crítica, desde que possa ser estabelecida uma ligação dos mAbs ou do composto espaçador à superfície. Entende-se que os materiais da estrutura de suporte, em cada caso, desde que estes possam entrar em contacto com as células ou com uma solução, devem ser fisiologicamente aceitáveis. De forma conveniente, a superfície da estrutura de suporte é formada por um polímero orgânico que é seleccionado, de um modo preferido, do grupo constituído por “poliestireno, poliuretano, poliéster, polivinilpiridina, polivinilamina, polietilenimina, quitosano e misturas de tais polímeros”. O polímero orgânico pode apresentar grupos reactivos, com o fim da ligação covalente de mAbs ou de compostos espaçadores que é, de um modo preferido, éter glicidílico. No caso do grupo de éter glicidílico, ocorre uma

ligação covalente de uma proteína ou péptido através da reacção de grupos amina primários da proteína ou péptido com este grupo.

Em função do polímero utilizado pode ser conveniente que o polímero orgânico esteja activado à superfície através de tratamento com um reagente de activação, o qual de um modo preferido é cloreto de *p*-toluenossulfonilo.

O diâmetro da estrutura de suporte encontra-se de forma conveniente na gama de 0,1 µm até 100 µm, de um modo preferido na gama de 1 µm até 20 µm, em especial na gama de 1 µm até 10 µm. O tamanho de partícula pode, por exemplo, ser determinada por meio de difractometria laser (Mastersizer x, Malvern Instruments, Herrsching) ou de espectroscopia de correlação fotónica (Zetasizer 4, Malvern Instruments, Herrsching). A superfície da estrutura de suporte pode ser 1 até 10 vezes, de um modo preferido, 1 até 4 vezes, a superfície geométrica, assumida como uma superfície esférica lisa.

Estruturas de suporte adequadas são, por exemplo, leitos magnéticos, como são utilizados para a separação de células por meio de ímans, por exemplo, Dynabeads da firma Dynal, ou também partículas de SiO₂. Além disso, também é possível, utilizar estruturas de suporte as quais sejam, de um modo preferido, biologicamente degradáveis, facto pelo qual as micropartículas podem ser administradas sem constrangimentos aos doentes. Polímeros adequados para tais estruturas de suporte são, por exemplo, descritas nos documentos da literatura WO 01/05875, Kissel et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 54: 99-134 (2002). No primeiro caso trata-se essencialmente de polietileniminas (PEI) e derivados destas. Os polímeros biologicamente

degradáveis podem também ser poliésteres modificados na carga, polivinilpiridinas ou polivinilaminas.

Além disso, a invenção ensina a utilização das micropartículas de acordo com a invenção para estimulação das células sanguíneas, em especial dos linfócitos T, linfócitos B, granulócitos, monócitos e/ou trombócitos. Aqui a estimulação pode decorrer *in vitro* ou *in vivo* (a última, em especial, nos casos de células negativas de CD28). No caso dos linfócitos T são estimulados, pelo menos, vários subgrupos. Assim, é também compreendida a utilização para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças com um número reduzido de células sanguíneas, em especial números reduzidos de linfócitos T, de doenças imunopatológicas (exemplos, ver abaixo) ou para potenciar a reacção imunológica em vacinações, em que é retirada uma amostra de sangue a um doente, em que opcionalmente da amostra de sangue são isoladas as células sanguíneas, em que as células sanguíneas são cultivadas *in vitro* sob adição de uma dose fisiologicamente efectiva de micropartículas, e em que as células sanguíneas assim obtidas são preparadas opcionalmente, galenicamente para injeção ou infusão. Também está igualmente compreendida a utilização das micropartículas de acordo com a invenção para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento com números reduzidos de células sanguíneas, de doenças imunopatológicas (por exemplo, artrite reumatóide, doenças intestinais inflamatórias, diabetes requerendo insulina, esclerose múltipla ou síndrome Guillain-Barré) ou para potenciar a reacção imunológica em vacinações, em que as micropartículas são preparadas galenicamente para injeção ou infusão. A preparação galénica para injeção pode ser para injeção i.m., i.p. ou i.v..

A invenção refere-se finalmente a um processo para a preparação de micropartículas de acordo com a invenção com os seguintes passos de processo: a) preparam-se micropartículas com uma superfície formada a partir de um ou vários polímeros orgânicos diferentes, b) a superfície é opcionalmente activada, c) as micropartículas assim obtidas são incubadas com uma solução contendo mAbs superagonistas específicos de CD28, em que os mAbs se ligam, de um modo preferido, de forma covalente à superfície, ou c') as micropartículas assim obtidas são em primeiro lugar incubadas com uma solução contendo um composto espaçador, em que o composto espaçador, se liga, de um modo preferido, de forma covalente à superfície, ocorrendo opcionalmente de forma subsequente um passo do processo de lavagem, e subsequentemente as micropartículas com o composto espaçador ligado são incubadas com uma solução contendo mAbs superagonistas específicos de CD28, em que os mAbs se ligam de forma covalente ou não covalente ao composto espaçador, e e) as micropartículas contendo mAbs superagonistas específicos de CD28 assim obtidas são separadas da solução e opcionalmente submetidas a um passo do processo de lavagem.

A invenção refere-se finalmente também a processos para a profilaxia e/ou tratamento das doenças descritas, em que a um doente são administradas as micropartículas de acordo com a invenção, preparadas de forma adequadamente galénica, ou em que de um modo preferido, células autólogas são estimuladas *in vitro* por meio das micropartículas de acordo com a invenção e depois da estimulação, sem ou com as micropartículas, implanta-se o preparado de forma adequadamente galénica.

Explicações relativamente às micropartículas são válidas contextualmente também para as utilizações e processos de acordo com a invenção.

Definições

A sequência de aminoácidos do CD28 humano é conhecida do acesso N° NM_006139.

mAbs superagonistas específicos de CD28 são obtidos, por exemplo, de células de hibridoma que estão depositadas sob os números de depósito DSM ACC2530 e DSM ACC2531. mAbs humanizados correspondendo a DSM ACC2530 apresentam sequências de cadeia leve bem como de cadeia pesada de acordo com a SEQ.ID 1 e 2.

Com estimulação ou activação de células sanguíneas, em especial linfócitos T, multiplica-se a actividade metabólica, aumenta-se o volume celular, sintetizam-se imunologicamente moléculas importantes e entra-se na divisão celular (proliferação) em função de um estímulo exterior.

Vários subgrupos das células T significa, pelo menos, os subgrupos de células T CD4 e CD8. As células T CD4 incluem, a par das células T negativas para CD25 "normais", também as células CD4⁺CD25⁺, as quais são também conhecidas como células T reguladoras. De acordo com verificações em modelos animais, o estado actual da técnica assume que as últimas desempenham um papel em numerosas doenças autoimunes e inflamatórias, como por exemplo, a esclerose múltipla, síndrome de Guillian-Barré, polineuropatia de desmielinação, etc. Um marcador útil para células T reguladoras é a forte expressão de CTLA-4 (CD152), que

é exprimida por células T não reguladoras apenas após activação e então também apenas em pequena extensão.

A designação de mAb compreende, a par de estruturas do tipo convencional Fab/Fc, também estruturas que consistem exclusivamente no fragmento Fab. Também é possível utilizar somente a região variável, em que o fragmento das cadeias pesadas é ligado de tal maneira com o fragmento da cadeia leve de forma adequada, também por meio, por exemplo, de moléculas-ponte sintéticas, de maneira que as regiões de ligação das cadeias formem a posição de ligação do anticorpo. A designação dos anticorpos compreende também anticorpos quiméricos bem como humanizados (completos).

A designação de mAb compreende, além disso, péptidos ou proteínas análogos dos próprios mAbs. Um análogo de péptido ou proteína é um péptido ou proteína, cuja sequência de aminoácidos de cada péptido ou proteína difere do qual é análogo, contudo liga um parceiro de ligação definido do próprio mAb com, pelo menos, a mesma afinidade. Variações na sequência podem ser deleções, substituições, inserções e elongações. Um análogo de péptido ou proteína apresenta, em geral, uma estrutura parcial terciária muito semelhante ao péptido ou proteína e/ou exposição no âmbito de uma proteína de (superfície celular) e por outro lado necessita, de resto, de ter ou de gerar na região análoga à ligação imediata apenas o local de ligação a péptido ou proteína para o parceiro de ligação definido ou para formar estas.

Um composto mimetizante de um mAb é uma estrutura química natural ou sintética que se comporta num ensaio de ligação definido como um mAb mimetizado pelo composto mimetizante.

Modulação superagonista da proliferação de células sanguíneas, em especial de células T, significa que nenhuma co-estimulação não é necessária, isto é, que não é necessário mais nenhum acontecimento de ligação a par de uma ligação (inicial) de um mAb ou de um composto mimetizante a CD28 para a estimulação ou inibição da proliferação.

A designação do tratamento compreende também a designação da profilaxia.

De seguida a invenção é explicada em mais detalhe com base somente em formas de realização representadas nos exemplos.

Exemplo 1: acoplamento directo de mAb a leitos magnéticos.

São utilizados leitos magnéticos activos à superfície da firma Dynal (Dynabeads). A superfície dos leitos é hidrofóbica e possui grupos de éter glicidílico. Ocorre uma ligação covalente de anticorpos através da reacção de grupos amina primários dos anticorpos com os grupos de éter glicidílico. Os leitos apresentam, pequenas esferas superparamagnéticas, de forma uniforme, com um núcleo de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 , o qual é revestido com um envelope de poliestireno. O diâmetro médio é de 4,5 μm . A densidade é de aproximadamente 1,5 g/cm^3 . A superfície apresenta 1 até 4 m^2/g de leitos. A superfície geométrica apresenta $6 \times 10^{-4} \text{m}^2/10^7$ Dynabeads (aproximadamente 0,9 m^2/g). As propriedades magnéticas são irrelevantes no âmbito da invenção; auxiliam no entanto no manuseamento no âmbito da preparação.

É retirado o número desejado de leitos da suspensão obtida após mistura exaustiva da suspensão (vortex, 5 minutos). 0

recipiente com os leitos é colocado num apoio magnético (30-60 segundos), de maneira que os leitos sejam sedimentados. O sobrenadante é retirado e o tampão de acoplamento é adicionado, no qual deve ocorrer a ligação dos anticorpos aos leitos (0,1 M de H_3BO_4 , pH 8,5, ajustado com NaOH). Os leitos são exaustivamente ressuspensos (vortex, pelo menos 2 minutos) e são lavados desta maneira. Este passo de lavagem é efectuado ao todo três vezes.

Para o acoplamento do anticorpo, os leitos no tampão de acoplamento fresco são ressuspensos cuidadosamente, (vortex, 30-60 segundos), em conjunto com o anticorpo superagonista específico de CD28 (huIgG-5.11, mAb completamente humanizado do isotipo IgG 4, derivado por tecnologia genética de um mAb de DSM ACC2530). A concentração dos leitos é de 4×10^8 /mL. Para cada 10^7 leitos são utilizados 5 μ g de mAb purificados. O recipiente de incubação com a mistura é fixa a um rotator, evitando a baixa rotação do recipiente de incubação a sedimentação dos leitos e assim uma separação da mistura reaccional. A incubação decorre 20-24 horas entre 4 °C e 37 °C, por exemplo, 20°C.

Depois da incubação, os leitos são sedimentados com auxílio do apoio magnético, o sobrenadante é removido e armazena-se para uma medição do teor de proteína. Os leitos são ressuspensos em tampão de lavagem (PBS sem Ca^{2+} e Mg^{2+} , 0,1% de BSA). A suspensão é lavada no rotator à rotação lenta durante 5 minutos a 4 °C. Este passo de lavagem é repetido ao todo três vezes com, respectivamente, tampão de lavagem fresco. Após terminado o passo de lavagem, os leitos são ressuspensos em tampão de lavagem e estão passíveis de serem utilizados. O armazenamento decorre a 4 °C.

Uma medição do teor de proteína do sobrenadante do acoplamento resulta numa porção de aproximadamente 50% da quantidade utilizada, de maneira que no máximo 50% da quantidade utilizada pode ser assumida como acoplada. Daqui calcula-se um número mínimo de leitos de $4 \times 10^6 / \mu\text{g}$ de mAb acoplado, ou $2,5 \mu\text{g mAb} / 10^7$ de leitos.

Exemplo 2: acoplamento indirecto de mAb a leitos magnéticos.

Procede-se em princípio de forma análoga ao exemplo 1, apenas que são utilizados Dynabeads Ig anti-ratinho. Aqui trata-se de leitos em cuja superfície se encontra acoplada covalentemente a imunoglobulina de ovelha anti-ratinho. Como tampão de acoplamento utiliza-se solução salina fisiológica tamponada com fosfato (PBS). Como mAb foram utilizados mAbs superagonistas específicos de CD28 de ratinho anti-humanos, que são passíveis de ser obtidos de DSM ACC 2530. A sua especificidade corresponde completamente àquela dos mAbs utilizados no exemplo 1, já que existe concordância nas zonas de ligação do antigénio. O mAb utilizado liga-se à imunoglobulina de forma não covalente de acordo com a figura 1.

Exemplo 3: estimulação *in vitro* num sistema PBMC.

Por poço de uma placa de 96 poços, cultivaram-se 2×10^5 de PBMC (células mononucleares periféricas de sangue, isto é, linfócitos T, linfócitos B e monócitos) em 0,2 mL de RPMI 1640 de meio de cultura com 10% de soro autólogo. Do dia 2 ao dia 3 foi efectuado um pulso de 16 horas com $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-timidina}$,

em que a timidina incorporada no ADN foi medida como determinação da proliferação. Os resultados da figura 2 comparam a capacidade do mAb hN4 5.11A1 superagonista humanizado de estimular PMBC humanos não separados (ou seja uma mistura de linfócitos T e receptor Fc possuindo linfócitos não T) na forma solúvel relativamente à forma acoplada a leito. Aqui, na abcissa é mostrada a quantidade respectiva de anticorpo de facto introduzida no sistema (numa forma solúvel ou ligada a leitos). A ordenada mostra a radioactividade incorporada como uma medida para a proliferação. Esta experiência representativa indica claramente que, em primeiro lugar, o anticorpo acoplado a leitos induz, num caso óptimo, a uma proliferação de longe mais forte que aquela apenas adicionada da forma solúvel, e que em segundo lugar, a actividade específica do anticorpo no contexto da indução da proliferação é aproximadamente 10 vezes superior quando ligado a leitos que quando adicionado ao anticorpo isolado.

Exemplo 4: estimulação *in vitro* de linfócitos T isolados.

Sob condições, de resto iguais, de cultivo e medição, como no exemplo 3, foram utilizados por poço 2×10^5 de linfócitos T purificados (obtidos por meio de filtração em lá de nylon). Na figura 3 é representada uma comparação da utilização de micropartículas do exemplo 1 com uma que utiliza as micropartículas do exemplo 1, porém não com as micropartículas acopladas a mAb. Adicionalmente é comparado o efeito estimulador com mAbs solúveis adicionados na presença e ausência de um anticorpo secundário (Ih anti-humano de burro) acoplado à superfície plástica. Reconhece-se que micropartículas não conjugadas não induzem nenhuma proliferação, enquanto

micropartículas possuindo mAb mostram uma actividade muito forte. Esta é muitas vezes mais elevada que a actividade que é conseguida por mAbs solúveis na presença ou ausência do anticorpo secundário immobilizado. É esperada a estimulação muito pequena comparada a PMBC não separados (figura 2) através de anticorpos solúveis adicionados, uma vez que faltam células com receptores para a parte Fc do anticorpo (FcR). A presença do reagente secundário immobilizado conduz a um ligeiro aumento da reactividade de anticorpos solúveis adicionados. Os leitos assumem a função receptora Fc de células positivas porém de uma maneira muito mais vezes eficiente.

Exemplo 5: subgrupos estimuláveis de células T

Linfócitos T purificados foram cultivados de forma correspondente ao exemplo 4, em que micropartículas foram utilizadas de acordo com o exemplo 2. Depois de 3 dias de cultura, as células foram estudadas no FACS relativamente à expressão do marcador de proliferação nuclear Ki67 depois de coloração intracelular. Aqui foram analisadas selectivamente células T CD4 ou CD8 através de "gating" electrónico após coloração simultânea com um anticorpo específico de CD4 ou CD8. As janelas estabelecidas estão representadas nas figuras 4a (células CD4⁺) e 4b (células CD8⁺). PE é a substância fluorescente ficoeritrina. Nos histogramas das figuras 4c até 4f apenas foram colocadas as células da secção respectivamente limitada pelas caixas (figuras 4c e 4e: células CD4⁺; figuras 4d e 4f: células CD8⁺). Nos histogramas decorreu um controlo de coloração com um anticorpo irrelevante (curva aberta) bem como a coloração com Ki67. FITC significa a substância fluorescente isotiocianato de fluoresceína. Uma consideração de comparação

das figuras 4c e 4d por um lado, bem como das figuras 4e e 4f por outro lado, mostra que sem estimulação, os histogramas de controlo e com Ki67 não diferem nada um do outro. Em contrapartida, com a estimulação com as micropartículas de acordo com a invenção, praticamente todas as células T CD4 e a maioria das células T CD8 são positivas para Ki67 e conseqüentemente proliferam. Os histogramas das figuras 4d e 4f são mais planos que aqueles das figuras 4c e 4e, porque existem menos células T CD4 que CD8.

Exemplo 6: estimulação de células T reguladoras.

Foram purificadas células T CD4 humanas através de filtração de lã de nylon e depleção imunomagnética de todas as outras populações de PMBC. Depois foram separadas as células T CD4 obtidas em fracções CD25 positivas e CD25 negativas por meio de selecção celular magnética (sistema MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemanha). Na figura 5a é representado a forma do histograma da expressão de CD25 de ambas as populações purificadas de células T CD4. A expressão de CD25 é visível através do desvio para a direita da curva de distribuição a cheio da fluorescência (CyChrome-acoplado a mAb específico de CD25) relativamente à curva vazia para as células CD25 negativas.

As células T CD4 obtidas como acima foram estimuladas 3 dias de acordo com o exemplo 2 com micropartículas. Depois foi analisada, através de coloração intracelular, a expressão de Ki67 (proliferação) e CTLA-4 (forte expressão é indicativa para células T reguladoras). As figuras 5b e 5d mostram os resultados para as células T CD25 negativas, em que as curvas abertas foram

obtidas de novo com um mAb irrelevante para fins de controlo. A figura 5b confirma que as células CD25⁻ proliferam. Apenas uma pequena parte das células CD25⁻ exprimem CTLA-4, como é visível da figura 5d. A figura 5c mostra que também as células CD25⁺ proliferam. A figura 5e confirma que a maioria das células CD25⁺ exprimem fortemente CTLA-4. No resultado é mostrado que não só as células T CD25⁻, mas também em especial as células T CD25⁺ são estimuláveis com as micropartículas de acordo com a invenção.

Lisboa, 16 de Dezembro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Micropartículas com uma estrutura de suporte, em que na estrutura de suporte se encontram ligados exclusivamente anticorpos monoclonais (mAb) superagonistas específicos de CD28 ou um composto mimetizante destes.
2. Micropartículas de acordo com a reivindicação 1, em que os mAbs estão ligados directamente e, de um modo preferido, de forma covalente à superfície da estrutura de suporte.
3. Micropartículas de acordo com a reivindicação 1, em que os mAbs estão ligados indirectamente à superfície da estrutura de suporte através de um composto espaçador ligado, de um modo preferido, de covalentemente à superfície da estrutura de suporte.
4. Micropartículas de acordo com a reivindicação 3, em o composto espaçador é seleccionado do grupo constituído por "polímeros orgânicos, péptidos, proteínas, e combinações de tais substâncias".
5. Micropartículas de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, em que a superfície da estrutura de suporte é formada por um polímero orgânico, o qual de um modo preferido, é seleccionado do grupo constituído por "poliestireno, poliuretano, poliéster, polivinilpiridina, polivinilamina, polietilenimina, quitosano e misturas de tais polímeros".

6. Micropartículas de acordo com a reivindicação 5, em que o polímero orgânico apresenta grupos reactivos, o qual é, por exemplo, éter glicidílico.
7. Micropartículas de acordo com a reivindicação 5 ou 6, em que o polímero orgânico é activado superficialmente através de tratamento com um reagente de activação, o qual é de um modo preferido, cloreto de *p*-toluenossulfonilo.
8. Micropartículas de acordo com uma das reivindicações 1 a 7, em que o diâmetro da estrutura de suporte se encontra na gama de 0,1 µm até 100 µm, de um modo preferido na gama de 1 µm até 20 µm, em especial na gama de 1 µm até 10 µm.
9. Micropartículas de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, em que a superfície da estrutura de suporte (medida por meio do método BET) é 1 a 10 vezes, de um modo preferido, 1 a 4 vezes a superfície geométrica, assumida como uma superfície esférica lisa.
10. Utilização de micropartículas de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, para a preparação de agentes para a estimulação de células sanguíneas, em especial, de linfócitos T, linfócitos B, granulócitos, monócitos e/ou trombócitos.
11. Utilização de acordo com a reivindicação 10, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças com números reduzidos de células sanguíneas, em especial, números reduzidos de linfócitos T, ou de doenças imunopatológicas ou para a potenciação da reacção imunológica em vacinações, em que a um doente é retirada

uma amostra de sangue, em que opcionalmente da amostra de sangue são isoladas as células sanguíneas, em que as células sanguíneas são cultivadas *in vitro* sob adição de uma dose fisiologicamente efectiva de micropartículas, e em que as células sanguíneas assim obtidas são preparadas de forma opcional, galenicamente, para injeção ou infusão.

12. Utilização de acordo com a reivindicação 10, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças com números reduzidos de células sanguíneas ou de doenças imunopatológicas ou para a potenciação da reacção imunológica em vacinações, em que as micropartículas são preparadas galenicamente, de um modo preferido, para injeção ou infusão.

13. Processo para a preparação de micropartículas de acordo com uma das reivindicações 1 a 9, com os seguintes passos de processo:

a) preparam-se micropartículas com uma superfície formada a partir de um ou vários polímeros orgânicos diferentes,

b) a superfície é opcionalmente activada,

c) as micropartículas assim obtidas são incubadas com uma solução contendo mAbs superagonistas específicos de CD28, em que os mAbs se ligam, de um modo preferido, de covalentemente à superfície, ou

c') as micropartículas assim obtidas são, em primeiro lugar, incubadas com uma solução contendo um composto espaçador, em que o composto espaçador, se liga, de um modo preferido, de covalentemente à superfície, ocorrendo opcionalmente de forma subsequente um passo do processo de lavagem, e subsequentemente as micropartículas com o

composto espaçador ligado são incubadas com uma solução contendo mAbs superagonistas específicos de CD28, em que os mAbs se ligam de covalentemente ou não covalentemente ao composto espaçador, e

e) as micropartículas contendo mAbs superagonistas específicos de CD28 assim obtidas são separadas da solução e opcionalmente submetidas a um passo do processo de lavagem.

Lisboa, 16 de Dezembro de 2009

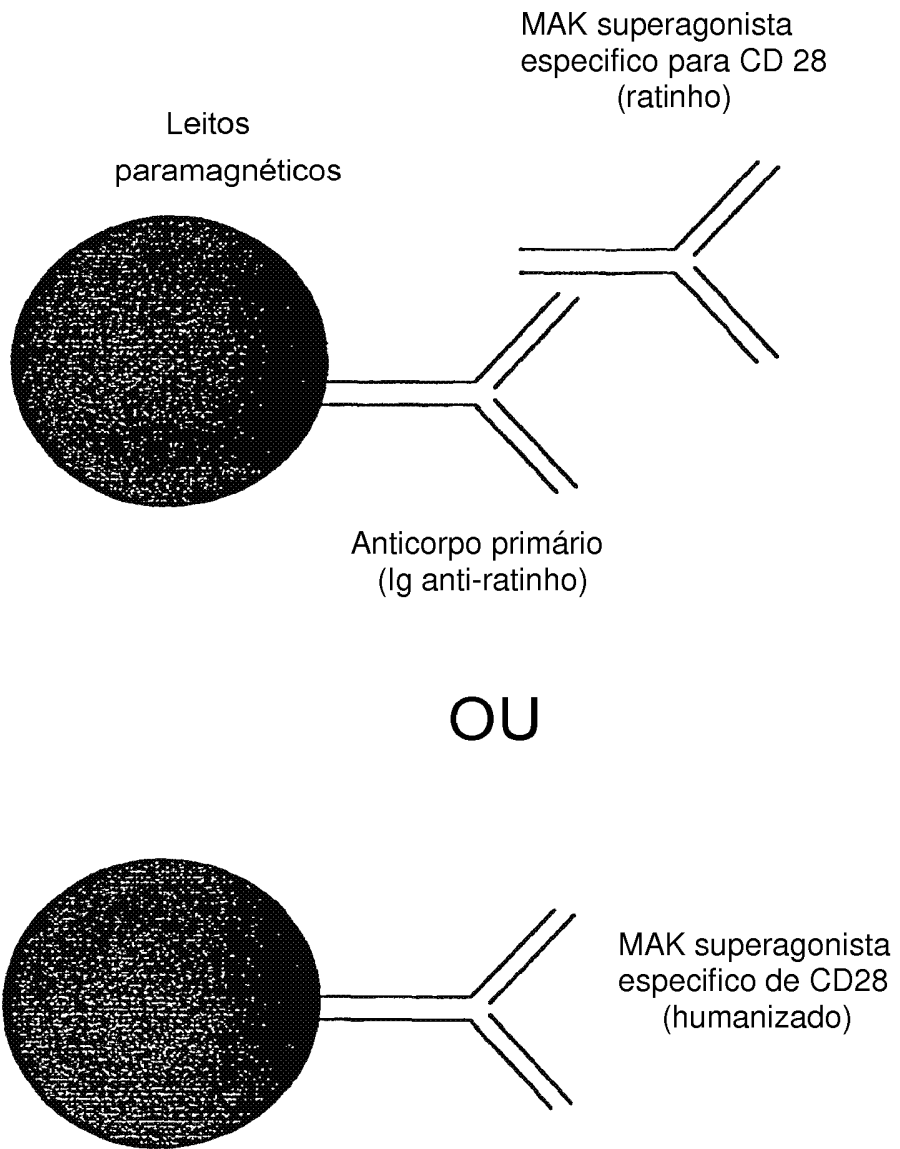


Fig. 1

Teste de proliferação - PBMC

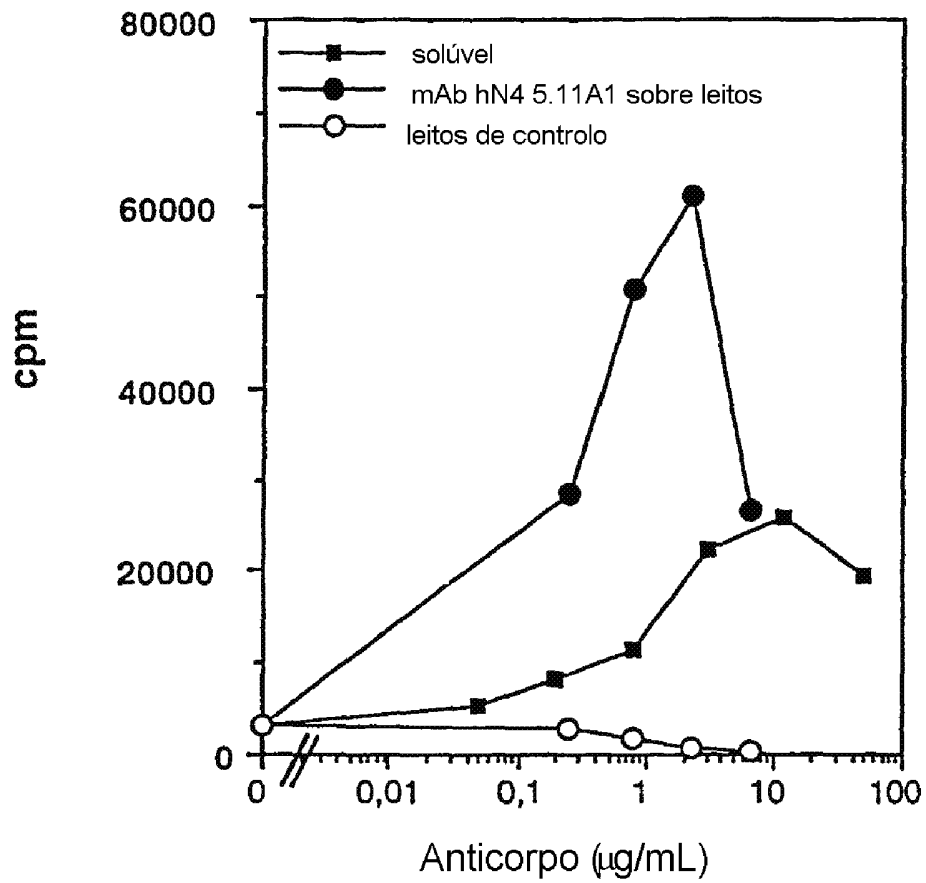


Fig. 2

Teste de proliferação - células T purificadas

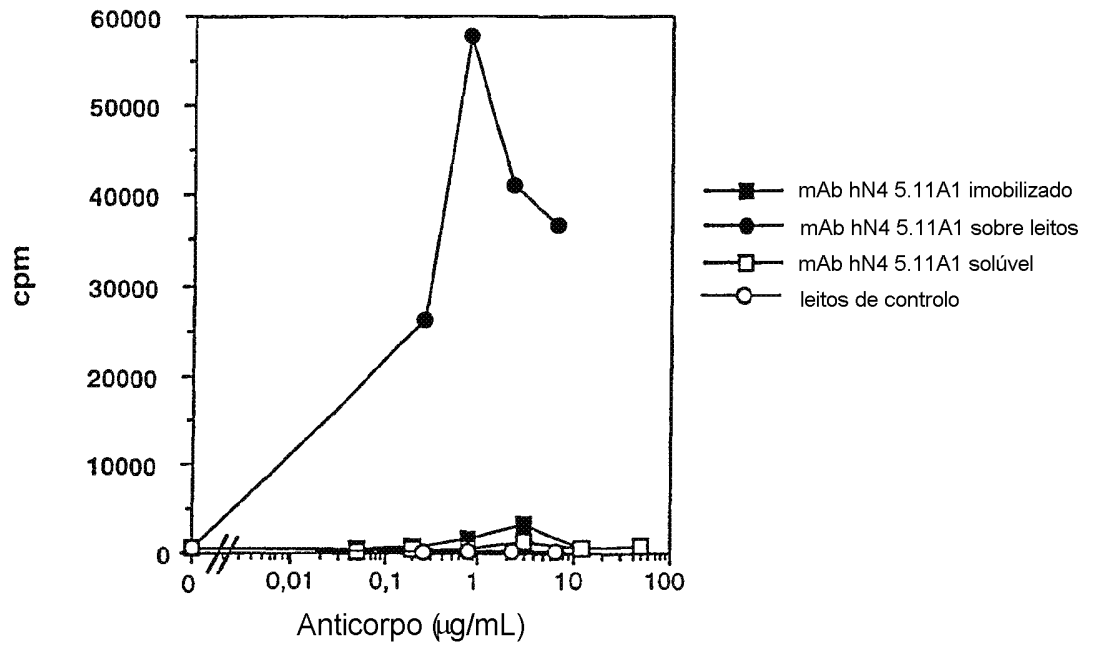


Fig. 3

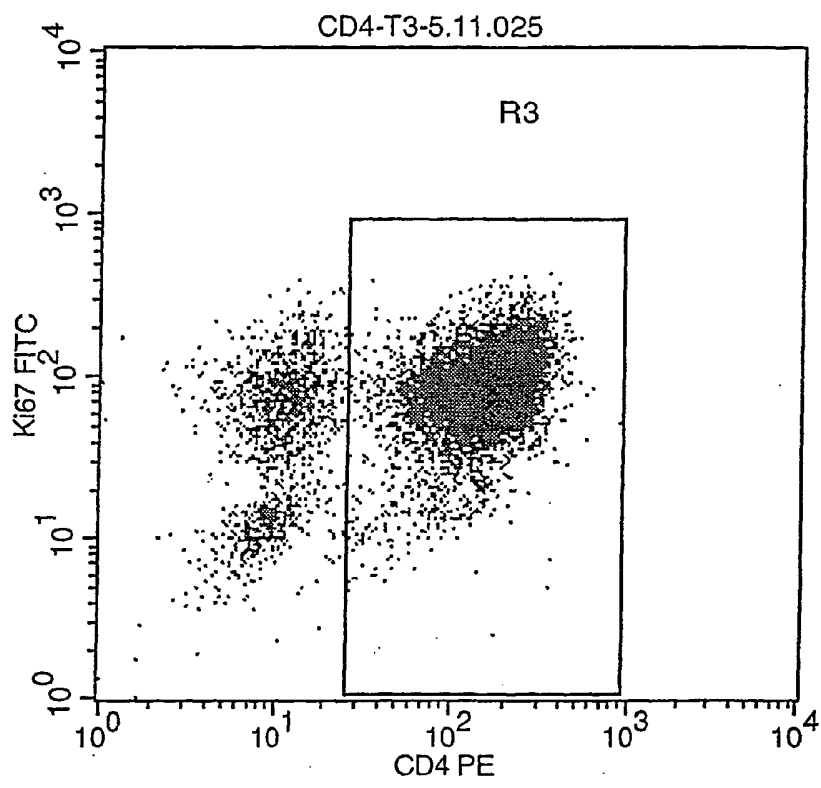


Fig. 4a

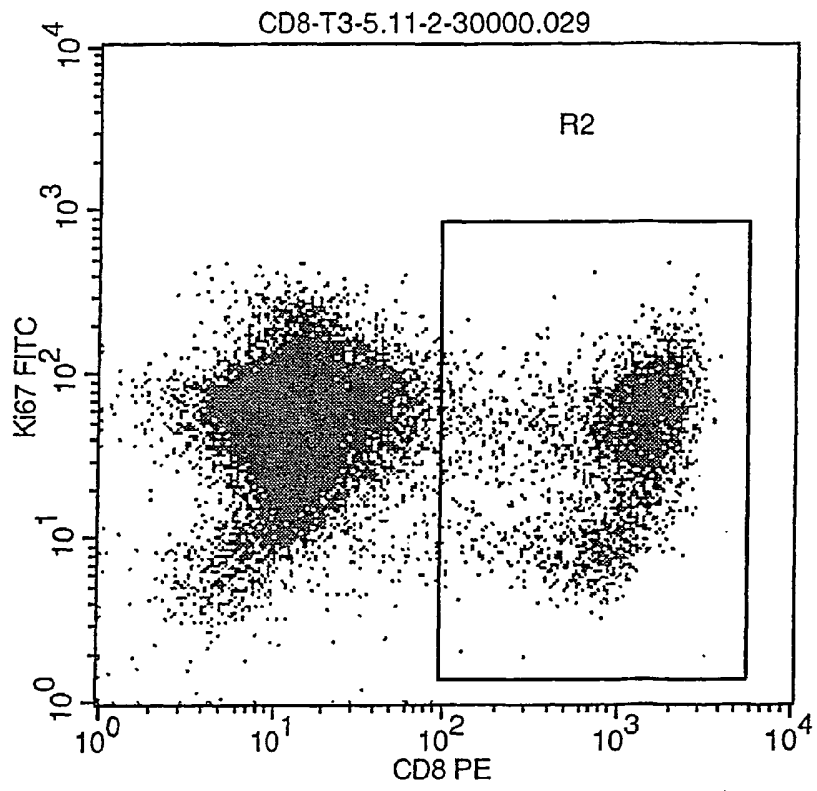


Fig. 4b

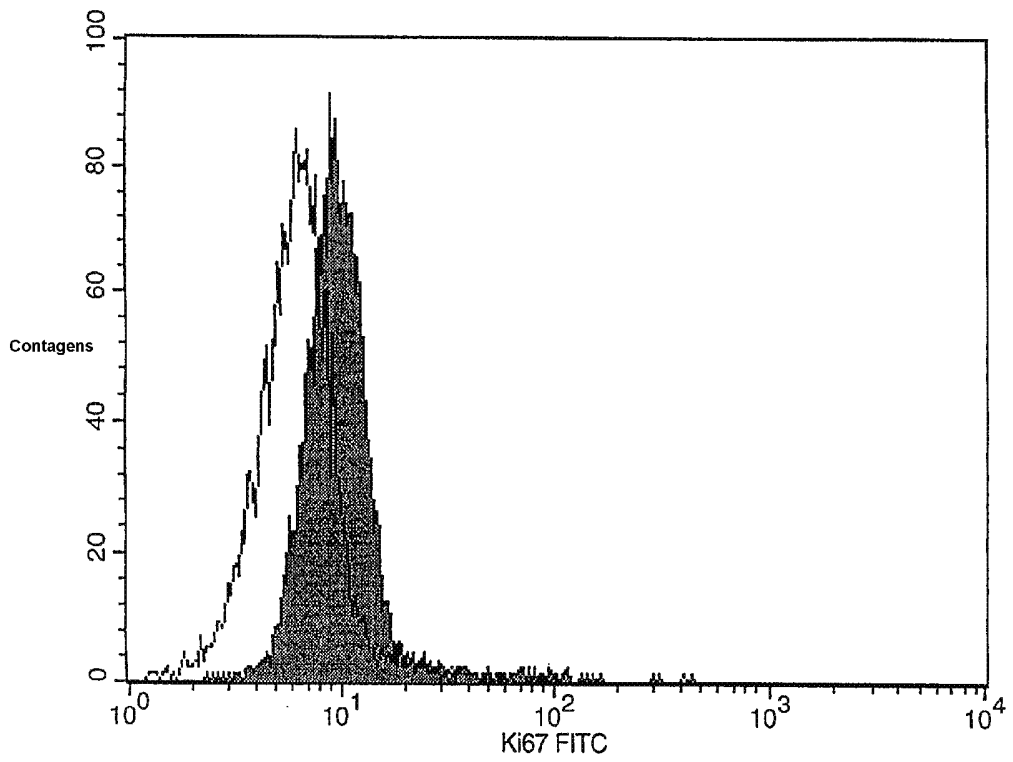


Fig. 4c

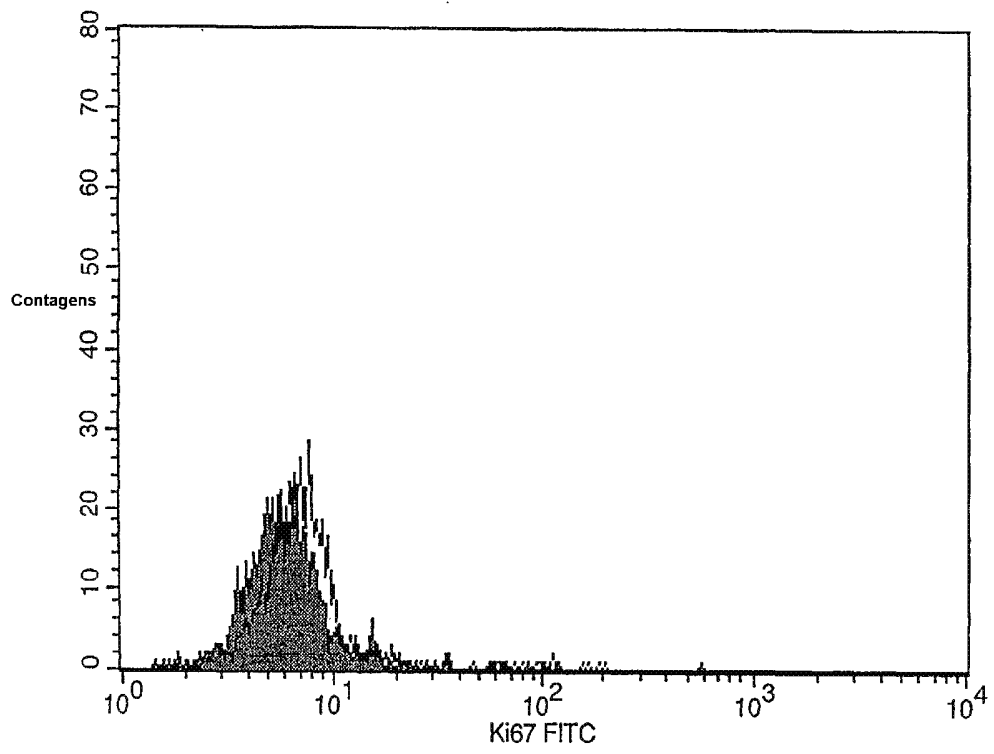


Fig. 4d

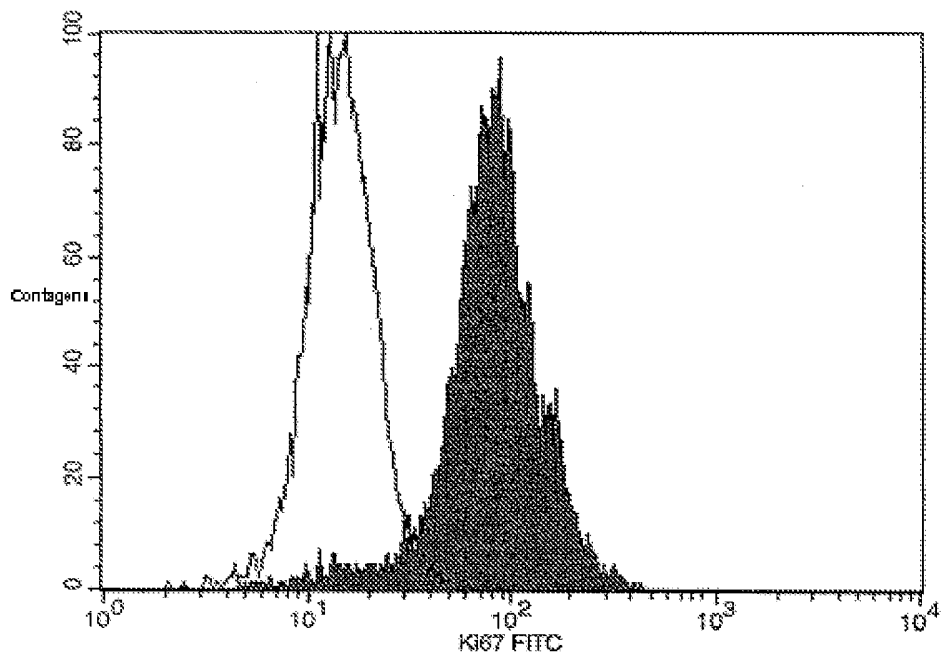


Fig. 4e

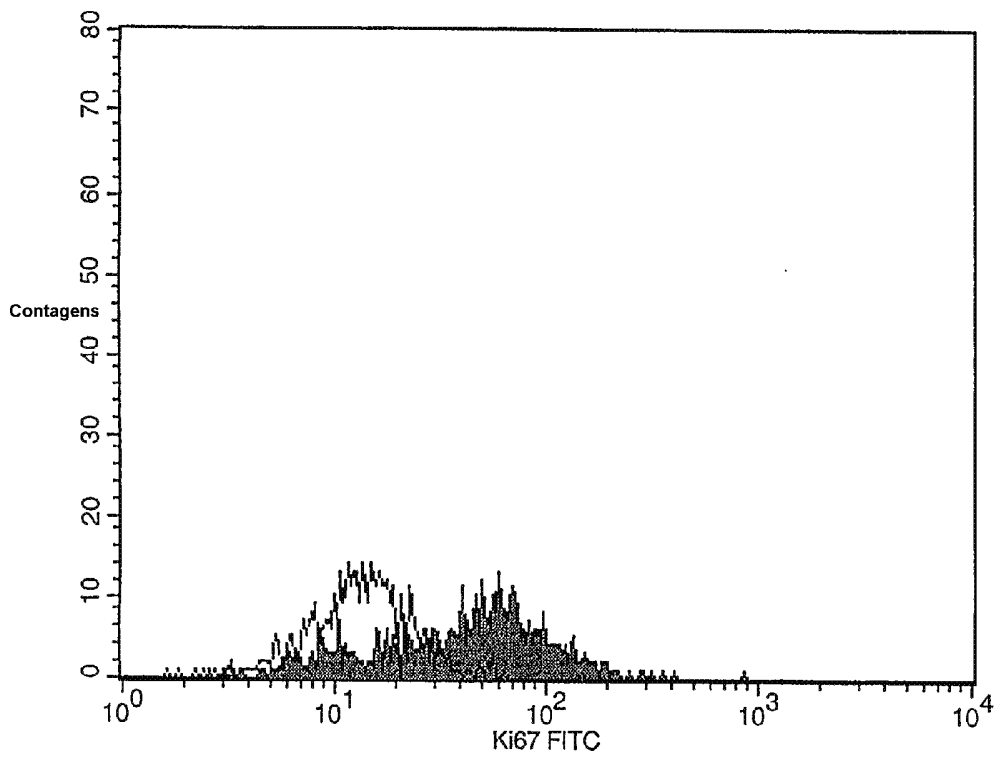


Fig. 4f

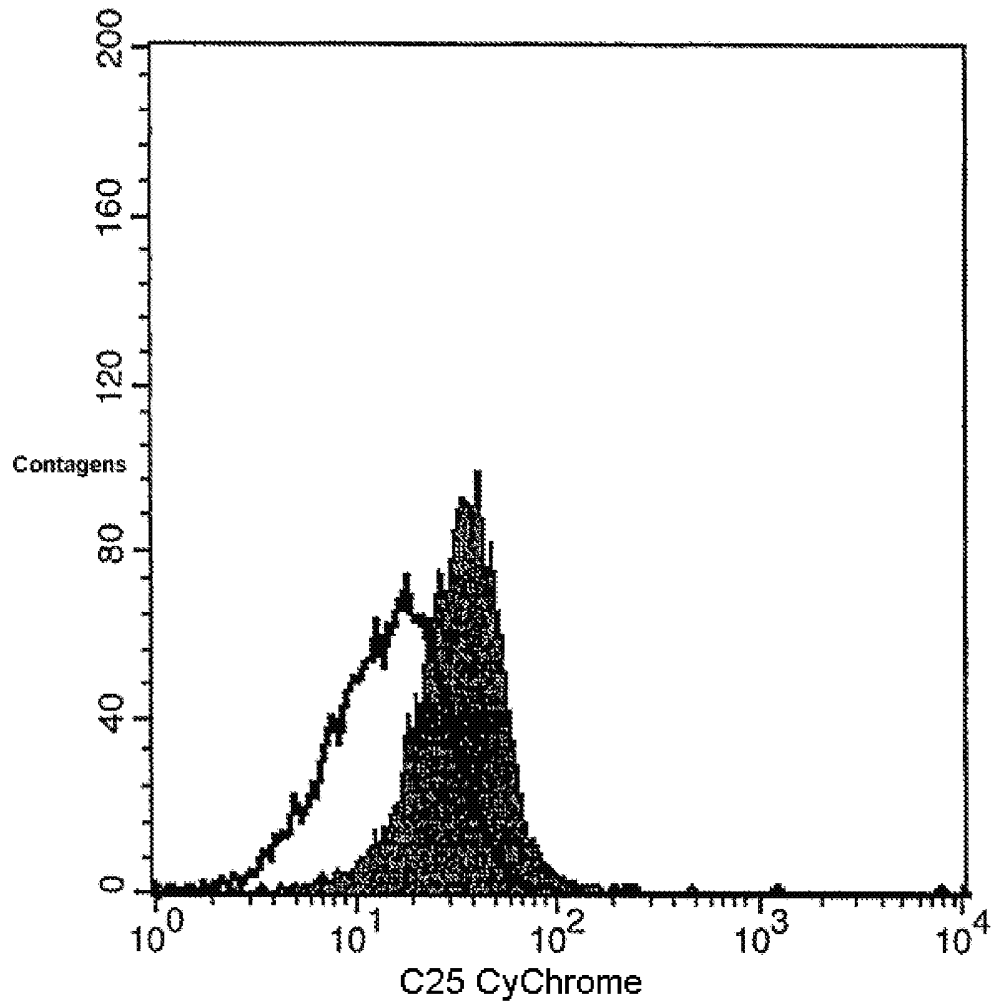


Fig. 5a

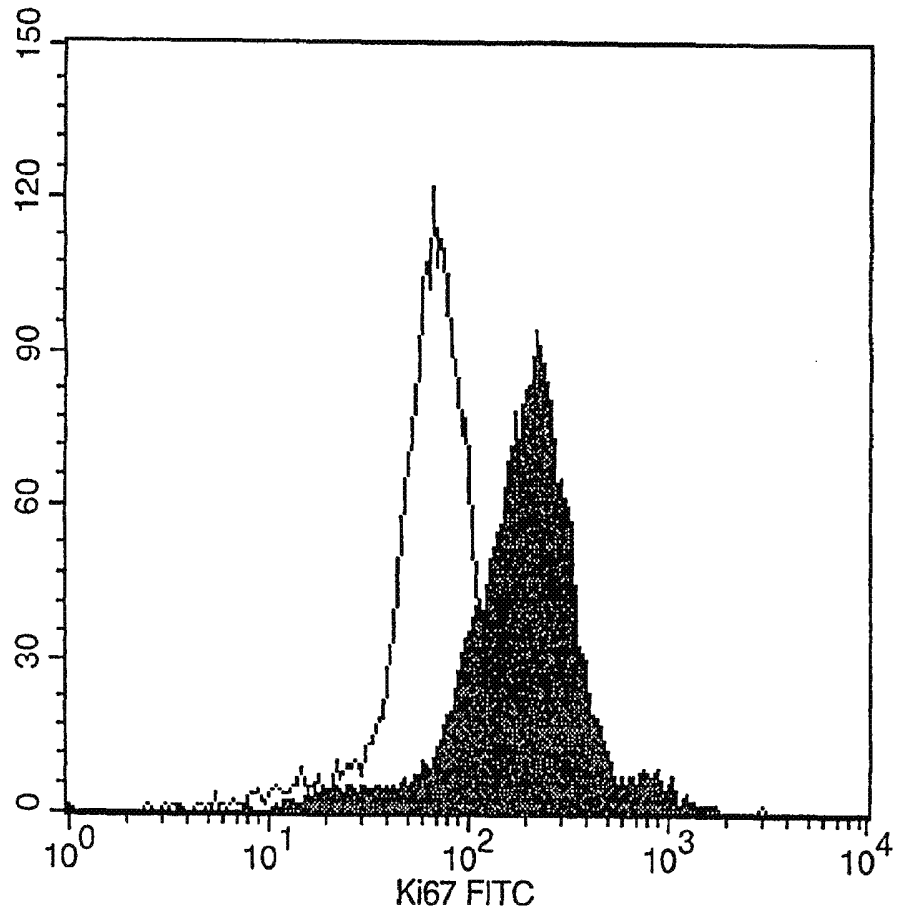


Fig. 5b

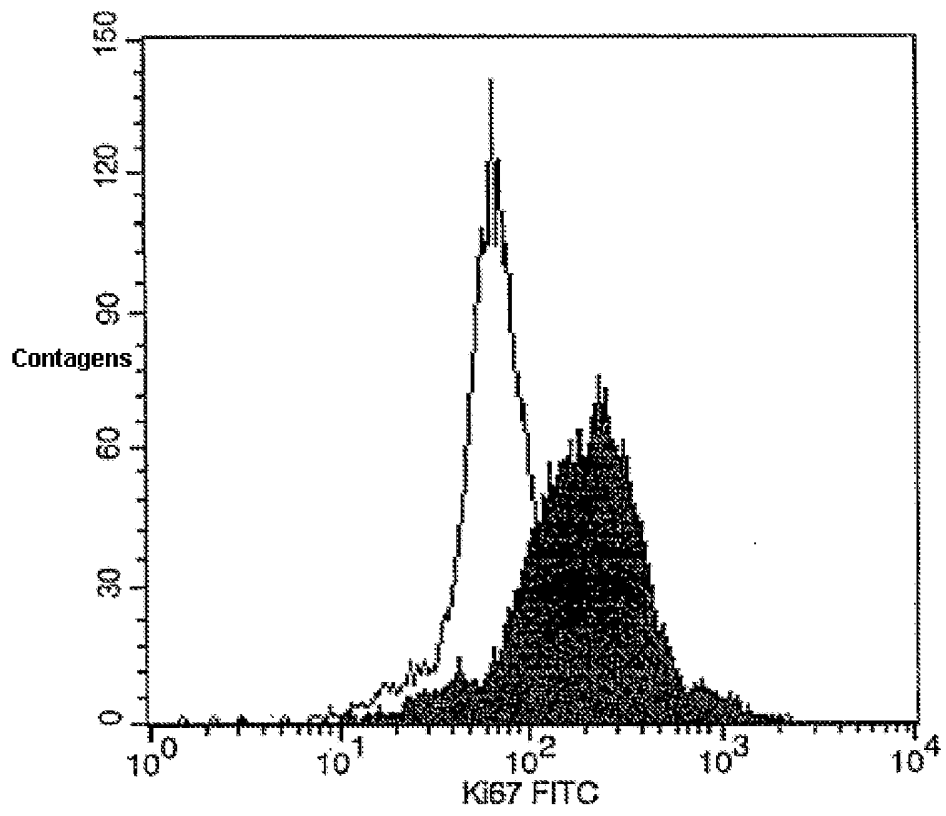


Fig. 5c

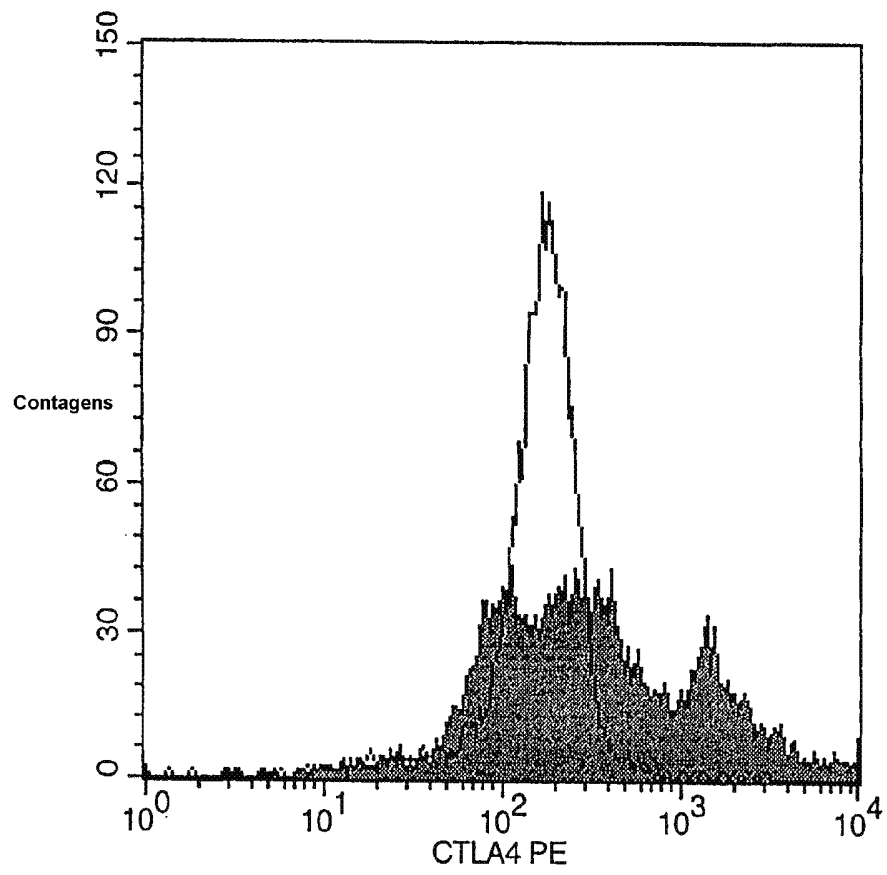


Fig. 5d

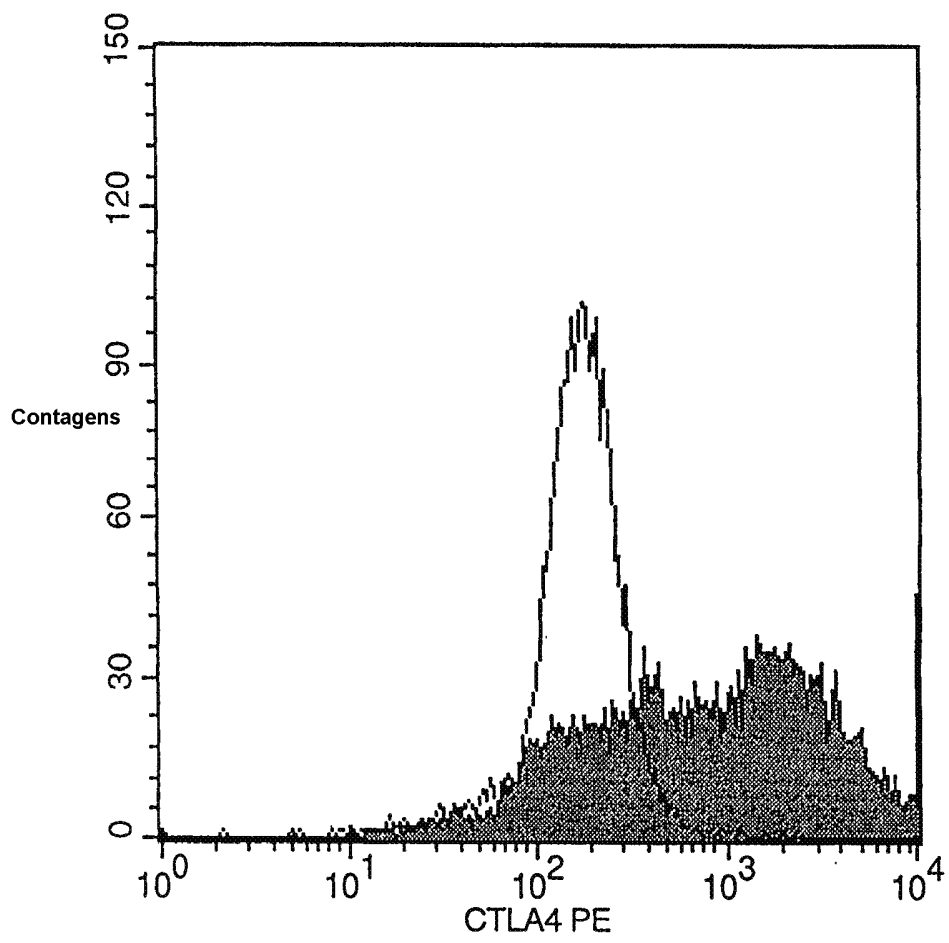


Fig. 5e

RESUMO

"MICROPARTÍCULAS COM ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS DE CD28"

A invenção refere-se a micropartículas com uma estrutura de suporte bem como anticorpos monoclonais (rAb) superagonistas específicos de CD28 ligados à estrutura de suporte ou um composto mimetizante destes.