



(19) INSTITUTO NACIONAL  
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* PT 93536 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C12P021/08 A A61K039/395 B  
A61K047/00 B G01N033/577 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1990.03.22	(73) <i>Titular(es):</i> BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT - D-3550 MARBURG/LAHN DE
(30) <i>Prioridade:</i> 1989.03.24 DE 3909799	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.11.07	(72) <i>Inventor(es):</i> KLAUS BOSSLET DE GERHARD SEEMANN DE HANS HARALD SEDLACEK DE BERNHARD AUERBACH GB
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 12/95 1995.12.15	(74) <i>Mandatário(s):</i> JOÃO DE ARANTES E OLIVEIRA RUA DO PATROCÍNIO 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (ACM) CONTRA ANTIGENES ASSOCIADAS A TUMORES E DE COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTÊM

(57) *Resumo:*

[Fig.]

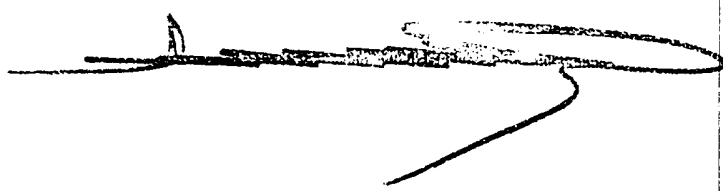


Descrição referente à patente de invenção de BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, alemã, industrial e comercial, com sede em D-3550 Marburg, Alemanha Ocidental, (inventores: Dr. Klaus Bosslet, Dr. Gerhard Seemann, Dr. Hans Harald Sedlacek e Dr. Bernhard Auerbach, residentes na Alemanha Ocidental), para "PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (ACM) CONTRA ANTIGENES ASSOCIADOS A TUMORES E DE COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTÊM".

#### DESCRIÇÃO

A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais (ACM) murinos, A, B, C e D, que são dirigidos contra antígenos associados a tumores. Descrevem-se as sequências nucleotídicas integrais vizinhas dos genes V destes anticorpos monoclonais de tal modo que os domínios variáveis respectivos são combinados para formar anticorpos monoclonais quiméricos, ou que se obtêm anticorpos monoclonais "humanizados" por integração das regiões hipervariáveis (Complementary Determining Regions = CDR) num esqueleto de um anticorpo monoclonal humano. Estas construções de anticorpos monoclonais são utilizáveis na terapia humana e no diagnóstico in vivo sem os inconvenientes observados dos anticorpos monoclonais murinos.

O ACM A reage contra um antígeno 3, o



ACM B contra um antígeno 11 e o ACM C contra um antígeno 7, os quais se encontram todos descritos na EP-A2-0 141 079 e apresentam antígenos associados a membranas de linhas de células de tumores humanos permanentes, como as linhas de células CaLu-1, Chago, Oat 75, PatuII e Bewo. O ACM D é dirigido contra um epítipo sensível à neuraminidase de Vibrio cholerae (NVC) do glicolípido GD<sub>2</sub>, que é exposto em linhas de células do melanoma humano.

Os ACMs A a D foram obtidos conforme descrito em EP-A2-0 141 079 e isolados de acordo com métodos normais.

O ACM A liga-se a células dos compartimentos dos granulócitos e a carcinomas do cólon e do pâncreas bem como a alguns carcinomas dos pulmões e da mama, como se apresenta no Quadro 1.

Quadro 1: Comportamento de ligação do ACM A

amostras de tecidos malignos investigados	número de positivos	número total
--	---------------------	-----------------

---

Carcinoma colorectal:

Carcinoma primário	6	6
Metástases no fígado	15	16

Carcinoma do pâncreas	6	8
-----------------------	---	---

Carcinoma do pulmão:

de células pequenas	1	2
adeno	9	10
epitélio plano	3	4
de células grandes	1	2

Carcinoma da mama	1	3
-------------------	---	---

O ACM B liga-se a quase todos os carcinomas do tracto gastrointestinal bem como a alguns carcinomas



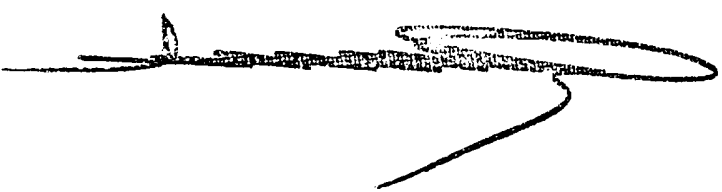
do ovário e ao adenocarcinoma do pulmão, enquanto que não reage com a maioria dos tecidos humanos normais ou apenas reage com estes tecidos com locais que contêm secreções. No Quadro 2 apresenta-se um resumo do comportamento de ligação.

Quadro 2: Comportamento de ligação do ACM B

amostras de tecidos malignos investigados	número de positivos	número total
Carcinoma colorrectal:		
primário	6	6
Metásteses no fígado	9	10
Carcinoma do pâncreas	5	6
Carcinoma do estômago	4	4
Carcinoma do pulmão:		
de células pequenas	2	11
adeno	9	10
epitélio plano	2	12
de células grandes	4*	12
Carcinoma da mama	2	9
Carcinoma do ovário (locais que contêm secreções)	4	6
Carcinoma dos rins	1	12

\* reacção fraca heterogênea

O ACM C apresenta uma reacção nítida com 70 a 80% dos tumores primários do carcinoma do pâncreas dos estádios I e II (11/14). As metásteses do carcinoma do pâncreas de grau I e II parecem reagir positivamente no seu desenvolvimento bem como os tumores primários (3/4). O tipo de reacção destes tecidos positivos significa, por consequência, que o epí



topo reconhecido pelo ACM C se encontra localizado no citoplasma sobre a membrana e no espaço intercelular.

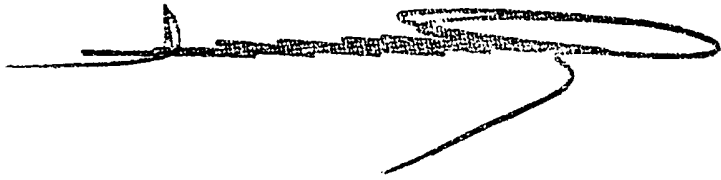
Os carcinomas do pâncreas de grau III não expressam o epítipo (tumor primário 0/2, metástases 0/5). Uma vez que no entanto os carcinomas do pâncreas dos graus I e II constituem até 95% dos carcinomas do pâncreas, o ACM C deve ser reactivo com 60 a 70% de todos os carcinomas do pâncreas.

Uma outra importante propriedade do ACM C é a sua reactividade com o sistema de canais no pâncreas com uma inflamação crónica (pancreatite 10/13), não sendo possível pelo contrário detectar qualquer ligação, no entanto, com tecidos pancreáticos saudáveis exócrinos e endócrinos (0/8). De entre os tumores primários de carcinoma do cólon estudados apenas uma minoria era reactiva (4/14), apresentando pelo contrário a maioria das metástases no fígado de carcinoma do cólon uma ligação nítida (7/10).

As reactividades cruzadas do ACM C são restritas às células em taça produtoras de muco da mucosa do cólon e do estômago. Todos os restantes tecidos normais ensaiados, incluindo os leucócitos do sangue periférico e a medula óssea, não expressam o epítipo associado a muco reconhecido pelo ACM C (ver Quadro 3). O ACM C reconhece um epítipo num antigene associado a tumores que pode ser detectado no soro de pacientes com tumores gastrointestinais como por exemplo o carcinoma do pâncreas em concentrações elevadas e como consequência pode ser utilizado como marcador tumoral.

Quadro 3: Revisão sobre os tecidos humanos investigados com ACM C (imunoperoxidades indirecta) fixados com formaldeído e incorporados em parafina.

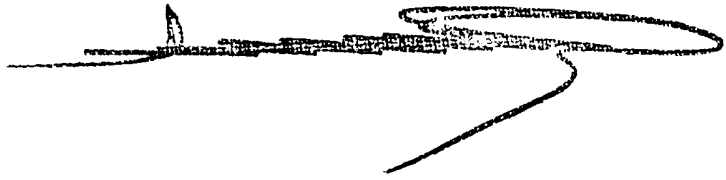
<u>Tumores do pâncreas</u>	Grau I	Grau II
Carcinoma primário	11/14	0/2
Mestâteses no fígado do carcinoma	3/4	0/5
Carcinoma das papilas		1/2
Adenoma cístico		0/1
<u>Tecidos do pâncreas</u>		
Canais pancreáticos alterados por pancreatite		10/13
Pâncreas exócrino e endócrino normal		0/8
<u>Carcinoma do cólon</u>		
Tumores primários		4/14
Metâteses no Fígado		7/10
<u>Tecidos normais do cólon</u>		
Células em taça da mucosa parte luminal		9/10
Parte da mucosa com actividade muscular		3/10
Mucosas musculares		0/7
Submucosa		0/7
Túnica muscular		0/7
<u>Carcinoma do pulmão</u>		8/18
	(pocas células tumorais)	
<u>Carcinoma da mama</u>		0/3



Quadro 3 (cont.)

	Grau I	Grau II
<u>Outros tecidos normais estudados</u>		
Pulmão		0/3
Fígado		0/5
Mama		0/1
Estômago	musculatura	0/2
	Células prod. muco	3/3
Rim		0/5
Gânglios linfáticos		0/4
Baço		0/2
Medula óssea		0/1
Leucócitos do sangue periférico		0/2
Tecido conjuntivo		0/2
Musculatura		0/10

O ACM D reconhece um epítipo sensível a NVC no gangliósido  $GD_2$ , o qual não ocorre em outros gangliósidos cerebrais de bovino incluindo  $GD_3$ ,  $GM_3$ ,  $GM_{1a}$ ,  $GD_{1b}$ ,  $GD_{1a}$  e  $GM_4$ . Por meio do ACM D é possível corar todos os gliomas, meningiomas e neurilemomas em tecido cerebral humano normal. No Quadro 4 apresentam-se as propriedades do ACM D com respeito a tumores intracranianos.



Quadro 4

<u>Classificação dos tumores</u>	<u>Números de tumores</u>	
	<u>positivos</u>	<u>número total</u>
Gliomas bem diferenciados, de grau I e II	6	6
Gliomas malignos, de grau III e IV	10	10
Meningiomas	11	11
Neurilemomas	4	4
<hr/>		
Adenoma da glândula pineal	0	5
Metásteses de carcinomas	0	1

Para além disso o epítipo definido pelo ACM D está presente em neuroblastomas, ganglioneuroblastomas e ganglioneuromas. No Quadro 5 apresenta-se um resumo.

•  
•  
•

Quadro 5: Reactividade do ACM D com neuroblastomas e tumores de pequenas células arredondadas infantis

Neurobrastomas	<u>Números de tumores</u>	
	<u>positivos</u>	<u>número total</u>
Grau I	1	1
Grau II	6	6
Grau III	4	4
<hr/>		
Ganglioneuroblastomas	3 <sup>xx</sup>	3
Sarcoma de Ewing	0	2
Sarcoma de Rhabdomyos	0	1
<hr/>		
Linfoma não de Hodgkin	2 <sup>xxx</sup>	5

x Classificação segundo Hughes

xx Células dos gânglios

xxx Algumas células tumorais positivas

O ACM D é por conseguinte adequado para o diagnóstico diferencial de neuroblastomas e de tumores de pequenas células arredondadas infantis.

A especificidade do ACM D em relação a dois outros dos tumores derivados da neuroectoderme, nomeadamente melanomas e carcinomas do pulmão de células pequenas (SCLC), bem como contra tumores não alterados é apresentada no Quadro 6.

Quadro 6:

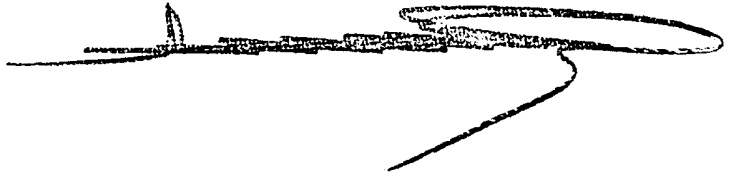
	<u>Números de tumores</u>	
	<u>positivos</u>	<u>número total</u>
Melanoma	4*	10
SCLC	2*	11
<hr/>		
Carcinoma do cólon	0	3
Carcinoma da mama	0	3
não SCLC:		
Adenocarcinomas	0	3
Carcinomas do pulmão-epitélio liso	0	3
Carcinomas de células grandes	0	3

\* Coloração fraca e heterogênea de algumas poucas células tumorais

Por meio do método descrito nos exemplos isolaram-se os genes V das imunoglobulinas de ACM A a ACM D.

As sequências nucleotídicas e proteicas são apresentadas nos Quadros 7 (gene V do ACM A), 8 (gene V do ACM B), 9 (gene V do ACM C) e 10 (gene V do ACM D). As CDR's são nestes casos identificáveis de acordo com Kabat e Wu (acima citados, ver Exemplos da página 10).

A presente invenção refere-se também aos epítomos especificados pelos ACM A, B, C e D, aos anticorpos monoclonais contra estes epítomos, dos quais são especialmente preferidos os ACM A, B, C e D, bem como a anticorpos monoclonais que contêm os genes V acima especificados ou partes des



tes (Complementarity Determining Regions), sendo preferida uma construção ou partes da construção de anticorpo monoclonal humano. Para além disso a presente invenção refere-se a construções que contêm estes genes V ou partes destes em conjunto com enzimas ou marcações radioactivas ou toxinas ou anticorpos monoclonais catalíticos ou diferentes especificidades de genes V ou antígenos da classe I ou da classe II de MHC ou componentes citolíticos. Finalmente a presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que contêm os referidos ACM e à utilização destes ACM para o diagnóstico in vitro ou in vivo.

A presente invenção é elucidada por intermédio dos exemplos e encontra-se definida pelas reivindicações.

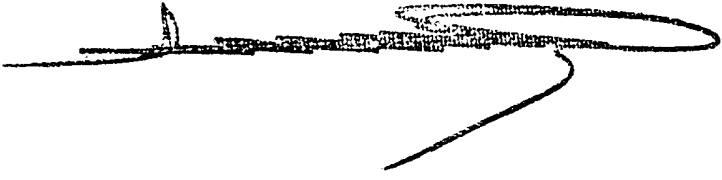
Exemplos:

Neste exemplo utilizou-se a reacção de cadeia de polimerase (PCR) de acordo com Saiki et al., Science 230, 1350-1354 (1985) para a clonagem e para a expressão dos domínios variáveis de imunoglobulinas (Ig) murinas.

1. Identificação de regiões conservativas nas extremidades 5' e 3' da cadeia pesada de Ig (VH) e da cadeia leve de Ig (VK) de murino

A partir dos dados de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. of Health and Human Services, US Government Printing Office (1987), retiraram-se as sequências orientadas uma após a outra das regiões variáveis. As sequências nucleotídicas iniciam-se na extremidade amino-terminal da proteína madura e não incluem sequências de sinal. Por meio de busca executada ao computador (DBUTIL, R. Staden (1986) Nucleic Acids Res. 14, 217-231) encontraram-se iniciadores apropriados para a síntese de ADNc e de amplímeros para utilização na PCR:





gene Kappa C (oligonucleótido II).

Em seguida destruiu-se o ARN por tratamento com NaOH. Efectuou-se a síntese do ADNc de cadeia dupla usando iniciadores oligonucleotídicos que hibridavam na extremidade 5' das sequências nucleotídicas  $V_H$  (oligonucleótido III) e  $V_{Kappa}$  (oligonucleótido IV).

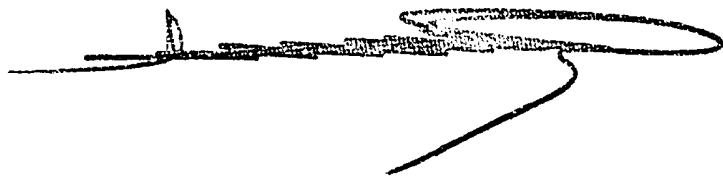
### 3. Amplificação do ADNc sintetizado e sequenciação dos domínios variáveis

O ADN obtido conforme descrito em 2. foi amplificado com o auxílio dos oligonucleótidos I, III, IV e V (o oligonucleótido V hibridou na região J da sequência nucleotídica  $V_{Kappa}$ ) e da enzima polimerase de ADN Taq de *Thermophilus aquaticus*. Um ensaio típico num volume total de 50  $\mu$ l continha 5  $\mu$ l de ADN (preparado em 2.) e 25 pmol de amplímero, com uma concentração de 250  $\mu$ M de cada um de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 65 mM de tris.HCl a pH 8,8, 17 mM de  $MgCl_2$ , 200  $\mu$ g/ml de gelatina e 2 unidades de polimerase Taq. A mistura reaccional foi coberta com uma camada de óleo de parafina e em seguida foi submetida a 25 ciclos cada um de 1 min a 95°C (para desnaturação), 1 min a 30°C (hibridação) e 2 min a 72°C (síntese de ADN) por meio de um bloco de aquecimento programável Teche PHC-1.

Os oligonucleótidos usados para a clonagem e a amplificação do ADNc contêm locais de corte por restrição. Por meio da clonagem e da amplificação do ADNc introduziram-se estes locais de corte por restrição na extremidade 5' e na extremidade 3' das sequências  $V_H$  e  $V_{Kappa}$  (Pst I e BstEII em  $V_H$  e Pvu II e BglIII em  $V_{Kappa}$ ).

Estes locais de corte por restrição foram em seguida utilizados a fim de clonar os fragmentos de ADNc de  $V_H$  e de  $V_K$  em vectores M13 (Lys 19, Lys 17) (Verhoyen et al., Science 239, (1988), 1534-1536).

Por fim determinaram-se as sequências nucleotídicas de cada um dos fragmentos de ADNc de  $V_H$  e de  $V_{Kappa}$  com o método de Sanger (PNAS, USA, 74, 5463-5467, (1977)) a partir dos vectores de Lys 19 e Lys 17 (ver Quadros 7, 8, 9 e



10).

Os exemplos 4 e 5 destinam-se a elucidar a utilização dos anticorpos monoclonais referidos para o diagnóstico de tumores malignos por meio do ACM C.


Exemplo 4:

Ligou-se o ACM C por adsorção nas paredes de alvéolos em placas de microtitulação (Nunc). Para cada um dos alvéolos preparados deste modo pipetaram-se 100  $\mu$ l da amostra e incubou-se durante 2 ou 3 h a 37°C. Após 3 lavagens com tampão de lavagem Enzygnost diluído (OSEW, BW), adicionaram-se a cada alvéolo 100  $\mu$ l de solução de conjugado. Os conjugados utilizados foram os da enzima peroxidase tanto com lecitina (por exemplo: aglutinina de gérmen de trigo (wheat germ agglutinin = WGA) como também com outros anticorpos que reconhecem outros epítomos dos antígenos associados a tumores definidos pelo ACM C. Em seguida efectuou-se uma fase de incubação de duas horas ou de três horas a 37°C com um triplo ciclo de lavagem.

Para a terceira fase de lavagem à temperatura ambiente pipetaram-se em seguida para cada alvéolo 100  $\mu$ l de uma solução tampão/substrato-cromogénico (OUVG/OUVF, BW) e fez-se terminar a reacção enzimática após 30 min com 100  $\mu$ l de solução de paragem Enzygnost (OSFA, BW). Mediu-se a extinção das amostras a 450 nm.

Resultado:

Os valores de extinção medidos como descrito correspondem nos seus máximos à concentração do/dos antígeno(s) na amostra. A concentração do antígeno definido por meio da ligação específica do ACM C no soro ou no plasma de pacientes com tumores malignos encontra-se nitidamente aumentada em comparação com indivíduos saudáveis de comparação ou com pacientes com doenças benignas. Esta condição foi verificada principalmente para pacientes com um carcinoma do pâncreas (Figura 1). Também se mediram concentrações nitidamente mais elevadas especialmente em pacientes com um carcinoma do estômago, do cólon ou do recto. Independentemente do sistema conjugado - tanto



de antocorpo-peroxidase (por exemplo Figura 1) como WGA-peroxidase - foram obtidos bons resultados comparáveis. A utilização do ACM C como componente de ligação específico permite preparar um ensaio de marcação de tumores sensível para doenças malignas e especialmente para doenças cancerosas gastrointestinais.

Exemplo 5:

Pipetaram-se para cada ensaio 5 ug do ACM C ou, para branco de comparação, 5 ug do ACM C50 (Pharmacia: Holmgren et al., British Medical Journal 288: 1479, (1984)) em 50 ul de PBS para um dispositivo de ensaio CA 19-9 (CA 19-9 EIA "Roche") com o padrão mais elevado (100 U/ml) antes do início da incubação. Após o fim do ensaio correspondente ao procedimento do ensaio original determinou-se a extinção de cada amostra.

Resultado:

Por meio da diluição adicional do antígeno padrão após adição da solução de PBS reduziu-se de modo insignificante o sinal do padrão mais elevado mesmo sem adição do ACM. Não se verificou qualquer outra redução do sinal por meio da presença do ACM C na mistura reaccional do ensaio. Em oposição a esta constatação, a formação do sinal foi completamente reprimida por meio do ACM C50, o qual se liga de forma específica, como sabido, entre outros ao epítipo de "sialosilo Le<sup>a</sup>" reconhecido pelo ACM 19-9 (Figura 2). Daqui é possível concluir que o ACM C reconhece um epítipo diferente do reconhecido pelo ACM 19-9.

Quadro 7

ACM A

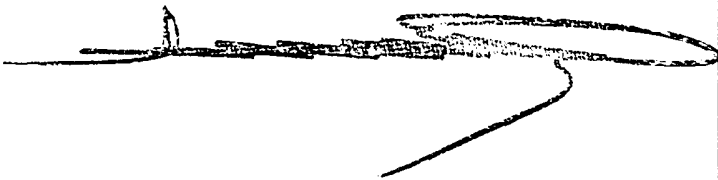
VH

Q V Q L Q E S G G G L V Q P G G S L R L  
CAGGTCCAACCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTC  
10 20 30 40 50 60  
S C A T S G F S D Y Y M N W V R Q P P G  
TCCTGCGCAACTTCTGGGTTTCAGTGATTACTACATGAACTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGA  
70 80 90 100 110 120  
K A L E W L G F I S N K P N G H T T E Y  
AAAGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTTCAAACAAACCTAATGGTCACACAACAGAGTAC  
130 140 150 160 170 180  
S A S V K G R F T I S R D N S Q S I L Y  
AGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATCCCAAAGCATCCTCTAT  
190 200 210 220 230 240  
L Q M N T L R A E D S A T Y Y C A R D K  
CTTCAAATGAACACCCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTATTGTGCAAGAGATAAG  
250 260 270 280 290 300  
G I R W Y F D V W G Q G T T V T V S S  
GGAATACGATGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
310 320 330 340 350

ACM A

VK

A I L S A S P G E K V T M T C R A S S S  
AGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAG  
10 20 30 40 50 60  
V S Y M H W Y Q Q K P G S S P K P W I Y  
TGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACCCTGGATTTA  
70 80 90 100 110 120  
A T S N L A S G V P A R F S G S G S G T  
TGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC  
130 140 150 160 170 180  
S Y S L T I I R V E A E D A A T Y Y C Q  
CTCTTACTCTCACAATCATCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA  
190 200 210 220 230 240  
Q W S S N P L T F G A G T K L E I  
GCAGTGGAGTAGTAACCCGCTCACGTTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGATC  
250 260 270 280 290



Quadro 8

ACM B

VH

L Q E S G P D L V K P S Q S L S L T C T  
 CTGCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTCAAACCTTCTCAGTCACTTTCACCTCACCTGCACT  
           10          20          30          40          50          60  
 V T G Y S I T S G Y S W H W I R Q F P G  
 GTCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGA  
           70          80          90          100          110          120  
 N K L E W M G Y I Q Y S G I T N Y N P S  
 AACAACTGGAATGGATGGGCTACATACAGTACAGTGGTATCACTAACTACAACCCCTCT  
           130          140          150          160          170          180  
 L K S R I S I T R D T S K N Q F F L Q L  
 CTCAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTCCTGCAGTTG  
           190          200          210          220          230          240  
 N S V T T E D T A T Y Y C A R E D Y D Y  
 AATTCAGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGAGAAGACTATGATTAC  
           250          260          270          280          290          300  
 H W Y F D V W G A G T T V T V S S  
 CACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
           310          320          330          340          350

ACM B

VK

L T Q S P A I M S A S L G E E I T L T C  
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAGGAGATCACCCCTAACCTGC  
           10          20          30          40          50          60  
 S T S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P  
 AGTACCAGCTCGAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACTTCTCCC  
           70          80          90          100          110          120  
 K L L I Y S T S N L A S G V P S R F S G  
 AAACCTTGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTTCTCGCTTCAGTGGC  
           130          140          150          160          170          180  
 S G S G T F Y S L T I S S V E A E D A A  
 AGTGGGTCTGGGACCTTTTATTCTCTACAATCAGCAGTGTGGAGGCTGAAGATGCTGCC  
           190          200          210          220          230          240  
 D Y Y C H Q W S S Y P T F G G G T K L E  
 GATTATTACTGCCATCAGTGGAGTAGTTATCCCACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCTGGAG  
           250          260          270          280          290          300



Quadro 9

ACM C

VH

Q V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K M  
 CAGGTCCAAGTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG  
 10 20 30 40 50 60  
 S C K A S G Y T F T Y Y V I H W V K Q K  
 TCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTTACTATGTTATTCAGTGGGTGAAACAGAAG  
 70 80 90 100 110 120  
 P G Q G L E W I G Y I H P Y N A G T E Y  
 CCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATACATTCATCCTTACAATGCTGGTACTGAGTAC  
 130 140 150 160 170 180  
 N E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y  
 AATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC  
 190 200 210 220 230 240  
 M E L S S L T S E D S A V Y Y C S M G R  
 ATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTTCAATGGGACGA  
 250 260 270 280 290 300  
 G G D Y W G Q G T T V T V S S  
 GGGGGTGACTIONACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA  
 310 320 330 340

ACM C

VK

L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C  
 CTGACCCAGTCTCCAGCAATTATGTCTGCATCTCCTGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC  
 10 20 30 40 50 60  
 S A S S S V S Y M H W Y Q Q K S G T S P  
 AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCC  
 70 80 90 100 110 120  
 K R W I Y D T S K L A S G V P A R F S G  
 AAAAGATGGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGC  
 130 140 150 160 170 180  
 S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A  
 AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCC  
 190 200 210 220 230 240  
 T Y Y C Q Q W S S N P F T F G A G T K L  
 ACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTCAGTTTCGGCGCGGGGACCAAGCTG  
 250 260 270 280 290 300

E I  
 GAGATC



Quadro 10

ACM D

VH

A E S G P G L V R L T S L S I T C T V S  
GCAGAGTCAGGGCCTGGCCTGGTGCGCCTCACGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCT  
10 20 30 40 50 60  
G F S L I S Y G V H W V R Q P P G K G L  
GGCTTTTCATTAATTAGTTATGGTGTACACTGGGTTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTG  
70 80 90 100 110 120  
E W L G V I W A G G S T N Y N S A L M S  
GAGTGGCTGGGAGTAATATGGGCAGGTGGAAGCACAATTATAATTCGGCTCTCATGTCC  
130 140 150 160 170 180  
R L S I S K D N S K S Q V F L K M N S L  
AGACTGAGCATCAGCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTG  
190 200 210 220 230 240  
Q T G D T A I Y Y C A R G G D D Y D G F  
CAAACCTGGTGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGGGGGGATGATTACGATGGGTTT  
250 260 270 280 290 300

ACM D

VK

L A Q S T K R K N Y L A W Y Q Q K P G Q  
TCTGGCTCAGAGTACAAAGCGAAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGTCA  
10 20 30 40 50 60  
S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F  
GTCTCCTAAACTACTGATCTACTGGGCATCCACTCGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTT  
70 80 90 100 110 120  
T G S G S G T D F T L T I S S V Q A E D  
CACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGA  
130 140 150 160 170 180  
L A V Y Y C K Q S Y N L R A F G G G T K  
CCTGGCAGTTTATTACTGCAAACAATCTTATAATCTTCGGGCGTTCGGTGGAGGGACCAA  
190 200 210 220 230 240  
L E I K  
GCTGGAGATCAAA  
250



REIVINDICAÇÕES

- 1ª -

Processo para a preparação de anticorpos monoclonais, caracterizado por se utilizar para imunização o epítipo que se liga aos anticorpos monoclonais (ACM) A, B, C ou D, sendo os ACM's A, B, C e D caracterizados pelos domínios variáveis de acordo com os Quadros 7, 8, 9 e 10, respectivamente.

- 2ª -

Processo para a preparação de anticorpos monoclonais, caracterizado por se integrar o ADNc dos domínios variáveis de acordo com os Quadros 7, 8, 9 ou 10 numa estrutura de anticorpo humano e se provocar a expressão num sistema de expressão apropriado.

- 3ª -

Processo para a preparação de anticorpos monoclonais, caracterizado por se integrar o ADNc dos domínios variáveis de acordo com os Quadros 7, 8, 9 ou 10 numa estrutura de anticorpo murino e se provocar a expressão num sistema de expressão apropriado.

- 4ª -

Processo para a preparação de uma compo

- 19 -

sição farmacêutica, caracterizado por se misturarem anticorpos monoclonais preparados de acordo com qualquer das reivindicações 1, 2 ou 3 com substâncias veiculares habituais.

- 5ª -


Processo para a preparação de agentes de diagnóstico, caracterizado por se utilizarem anticorpos monoclonais preparados de acordo com qualquer das reivindicações 1, 2 ou 3.

A requerente reivindica a prioridade do pedido alemão apresentado em 24 de Março de 1989, sob o nº. P 39 09 799.4.

Lisboa, 22 de Março de 1990.

O AGENTE OFICIAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL





RESUMO

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (ACM)  
CONTRA ANTIGENES ASSOCIADOS A TUMORES E DE COMPOSIÇÕES  
FARMACÊUTICAS E DE DIAGNÓSTICO QUE OS CONTÊM"

A invenção refere-se a um processo para a preparação de anticorpos monoclonais que compreende utilizar-se para imunização o epítipo que se liga aos anticorpos monoclonais (ACM) A, B, C ou D, sendo os ACM's A, B, C e D caracterizados pelos domínios variáveis de acordo com os Quadros 7, 8, 9 e 10, da descrição, respectivamente.

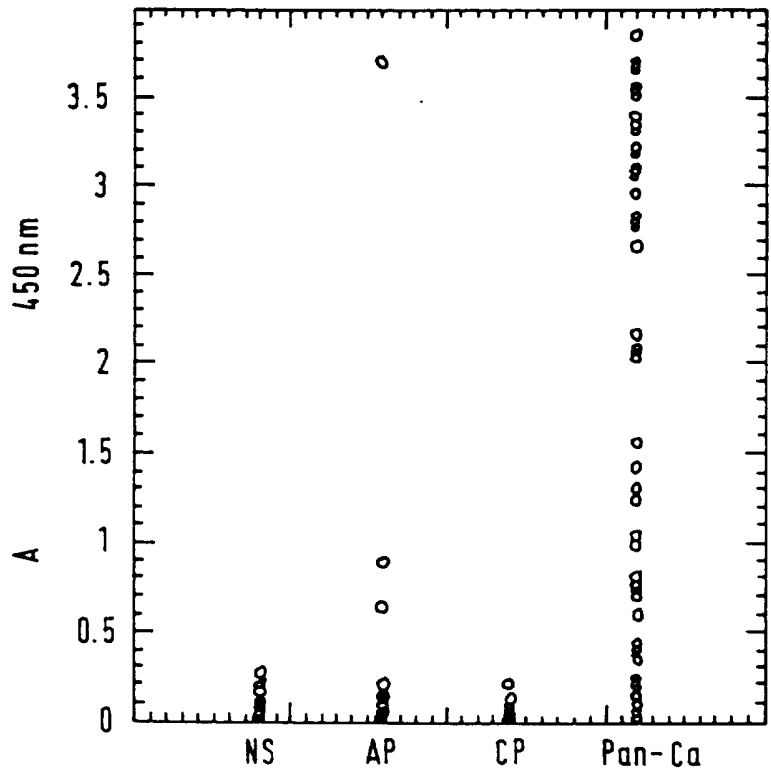
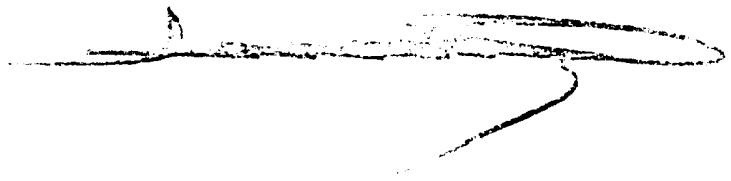
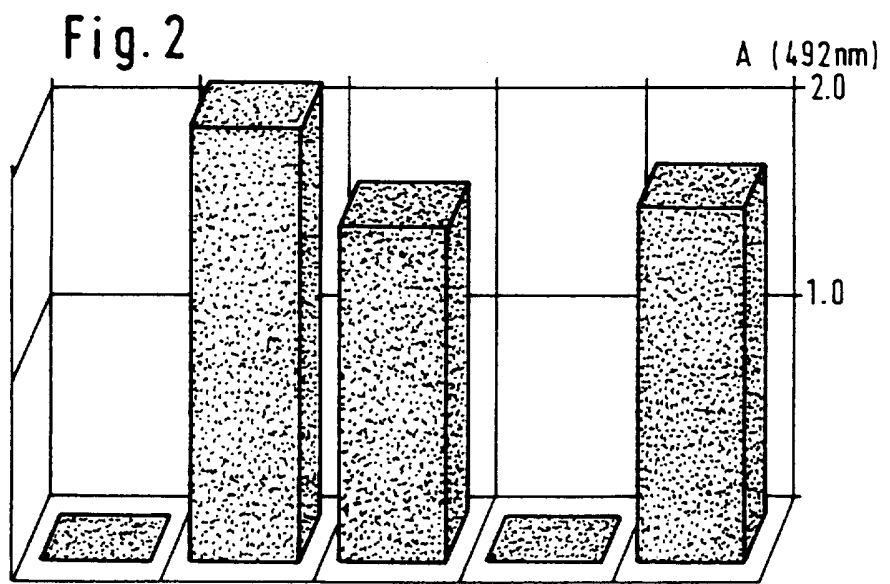
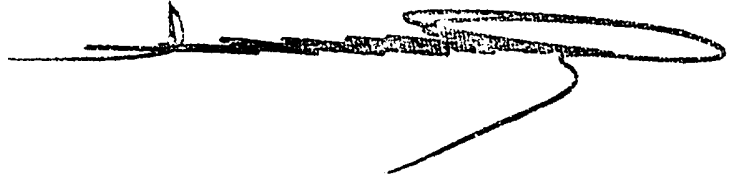


Fig.1



CA 19-9: 0 100 100 100 100 (U/ml)  
 Mak: - - - C50 C



LEGENDA DA FIGURA 1:

NS significa amostras de soro de dadores de sangue saudáveis (n=141);  
AP significa amostras de soro de pacientes com pancreatite aguda (n=56);  
CP significa amostras de soro de pacientes com pancreatite crónica (n=40) e  
Pan-Ca significa pacientes com carcinoma do pâncreas (n=82);  
A significa extinção.

LEGENDA DA FIGURA 2:

Ver Figura 1; (A 19-9 significa ACM CA 19-19).