(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 648783 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07K016/28 A C12N015/13 B
C12N015/62 B C12P021/08 B
A61K039/395 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1994.10.11

(30) *Prioridade:* 1993.10.12 IL 10726793

(43) *Data de publicação do pedido:* 1995.04.19

(45) *Data e BPI da concessão:* 2000.03.29

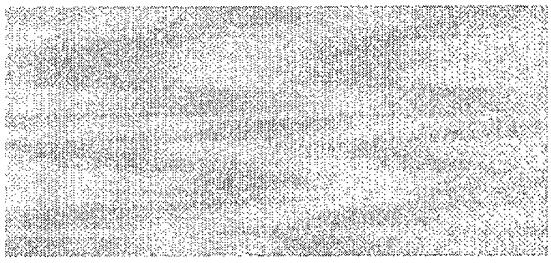
(73) *Titular(es):*
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD. IL
P.O. BOX 95 REHOVOT 76100

(72) *Inventor(es):*
DAVID WALLACH IL
JACEK BIGDA PL
IGOR BELETSKY RU
IGOR METT IS

(74) *Mandatário(s):*
JOSÉ EDUARDO LOPES VIEIRA DE SAMPAIO
RUA DO SALITRE, 195 R/C DTO 1250 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* INIBIDORES DO FNT

(57) *Resumo:*



Campo das Cebolas - 1149 - 035 LISBOA
Telefs.: 01 888 51 51 / 2 / 3
Linha azul: 01 888 10 78 • Fax: 01 887 53 08 - 886 00 66
E-mail: inpi @ mail. telepac. pt

REF.: H 517 EP

INPI
INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. [X] MOD. UTI. [ ] MOD. IND. [ ] DES. IND. [ ] TOP. SEMIC. [ ]
N.º Objectos ___ N.º Desenhos ___

N.º 648.783 (11) DATA DO PEDIDO ___/___/___ (22)

CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)

REQUERENTE (71) (NOME E MORADA)
YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD., israelita, industrial, com sede em P.O. Box 95, Rehovot 76100, Israel

CÓDIGO POSTAL ____

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)
WALLACH, DAVID; BIGDA, JACEK; BELETSKY, IGOR e METT, IGOR

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO	PAÍS DE ORIGEM	N.º DO PEDIDO

FIGURA (para interpretação do resumo)

COLAR FIGURA

EPÍGRAFE (54)
"INIBIDORES DO FNT"

NÃO ESCREVER NAS ZONAS SOMBREADAS

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A invenção descreve ligandos para os receptores do Factor da Necrose Tumoral (R-FNT), os quais inibem o efeito do FNT mas não a sua ligação aos R-FNT, e descreve também os ligandos que interactuam com os outros receptores da família de receptores de FNT/FCN, descrevendo ainda os métodos para a sua produção.

SOCIEDADE TIPOGRÁFICA, S.A.

Descrição

"Inibidores do FNT"

A presente invenção refere-se aos ligandos dos receptores do factor da necrose tumoral (R-FNT) que inibem o efeito do FNT mas não inibem a sua ligação aos R-FNT, e refere-se também aos ligandos que interactuam com outros receptores da família FNT/FCN.

O factor de necrose tumoral (FNT) é uma citoquina pleiotrópica produzida por diversos tipos de células, principalmente pelos macrófagos activados. É um dos principais mediadores da resposta imunitária e inflamatória. O interesse sobre a sua actividade aumentou imenso recentemente, dada a evidência do envolvimento do FNT na patogénese de um grande conjunto de estados patológicos, incluindo o choque endotóxico, a malária cerebral e a reacção do hospedeiro face ao enxerto. Uma vez que muitos dos efeitos do FNT são prejudiciais para o organismo, é de grande interesse encontrar formas de bloquear a sua acção nas células hospedeiras. Um alvo evidente para tal intervenção é o conjunto das moléculas às quais o FNT tem de se ligar para exercer os seus efeitos, designadamente os R-FNT. Tais moléculas existem não só em formas ligadas às células mas também em formas solúveis, compreendendo os domínios clivados extracelulares dos receptores intactos (ver Nophar *et al.*, EMBO Journal, 9(10): 3269-78, 1990). Os receptores solúveis conservam a capacidade de se ligarem ao FNT e por tal motivo têm capacidade para bloquear a sua actividade por competição com os receptores superficiais.

Um outro método de inibição do FNT, com base no princípio da competição com as moléculas ligadas às células, consiste em utilizar anticorpos que reconhecem os receptores do FNT e que bloqueiam a ligação dos ligandos.

Os R-FNT da superfície celular são expressos em quase todas as células corporais. Todos os efeitos do FNT, incluindo os efeitos citotóxicos, de favorecimento do crescimento e outros, são sinalizados pelos receptores do FNT (o mesmo que TNF) quando estes se ligam ao FNT. Foram já descritas duas formas destes receptores que diferem entre si pelo seu tamanho molecular: os receptores de 55 e 75 quilodaltons doravante aqui designados respectivamente por p55 e p75 de R-FNT. No entanto, faz-se observar que há publicações que designam estes receptores também por p60 e p80.

Os R-FNT pertencem a uma família de receptores que estão implicados noutros processos biológicos críticos. Como exemplos destes receptores indica-se o receptor do FCN (o mesmo que NGF) de fraca afinidade que desempenha uma função importante na regulação do crescimento e na diferenciação de células dos nervos. Há outros receptores que estão implicados na regulação do crescimento dos linfócitos, tais como o receptor CDw40 e outros. Outro membro da família é o receptor FAS também designado por APO, que é um receptor implicado na sinalização para a apoptose e para o qual se presume, com base num estudo efectuado com murganhos com actividade deficiente deste receptor, que desempenha um papel importante na etiologia de uma doença de tipo lúpus. Na presente memória descritiva, esta família de receptores é designada por "família de receptores FNT/FCN".

Uma das particularidades mais notáveis do FNT, comparativamente com outras citoquinas, se bem que contribua para a patogénese de várias doenças, é a sua capacidade para eduzir a morte celular. Admite-se que a actividade do FNT, aniquilidora das células, seja induzida pela receptor p55. No entanto, esta actividade do receptor p55 pode ser auxiliada pelo receptor p75 através de um mecanismo ainda desconhecido.

O pedido de patente de invenção europeia nº E-A1-0 412 486 descreve anticorpos para os R-FNT solúveis. Comprovou-se que estes anticorpos reconheciam os R-FNT solúveis e que inibiam a ligação do FNT aos R-FNT sobre a superficie das células. O fragmento mono-valente (F(ac) (o mesmo que F(ab)) bloqueou o efeito do FNT, ao passo que os anticorpos intactos imitaram o efeito citotóxico do FNT. O pedido de patente de invenção europeia nº EP-A2-0 585 939 descreve ligandos que interactuam com uma determinada região dos R-FNT. Masters, J. Biol. Chem. 467 (1992), 5754-5750, afirma que os p55 e p75 R-FNT, semelhantes a outras proteínas da superficie das células, incluindo os receptores do factor de crescimento do nervos, contêm uma sequência de aminoácidos com um padrão repetitivo de quatro domínios ricos em cisteína.

A presente invenção proporciona um ligando para um membro da família de receptores de FNT/FCN, o qual se liga quer a uma região do quarto domínio rico em cisteína de um tal receptor quer à região situada entre esse domínio e a membrana celular.

A região do quarto domínio rico em cisteína será aqui designada, por razões de simplicidade, por "epítopo 67" e os anticorpos que a reconhecem são aqui designados por anticorpos do "grupo 67". Esta região pode estar compreendida entre os aminoácidos pro-141 e thr-179 no p75 R-FNT ou pode ser uma região correspondente noutro membro da família dos receptores de FNT/FCN. Mais particularmente, a região pode estar compreendida entre os aminoácidos cis-163 e pro-141 do p75 R-FNT ou pode ser uma região correspondente noutro membro da família dos receptores de FNT/FCN. O ligando a jusante do quarto domínio rico em cisteína compreende a sequência de aminoácidos entre o thr-179 e a extremidade do domínio extracelular do receptor ou uma região correspondente noutro membro da família dos receptores de FNT/FCN.

De preferência, o receptor é o R-FNT, em particular o p75 R-FNT.

Um desses ligandos compreende a sequência de aminoácidos para a região RDC (o mesmo que CDR) da cadeia pesada do anticorpo monoclonal nº 67 e/ou da sua cadeia leve.

Um outro de tais ligandos compreende a sequência de aminoácidos da RDC da cadeia pesada do anticorpo monoclonal nº 81 e/ou da sua cadeia leve.

Há ainda um outro desses ligandos que compreende a sequência de aminoácidos para o anticorpo contra a região "pedunculada", isto é, a região compreendida sensivelmente entre o aminoácido thr-181 e o aminoácido 235-asp.

Os ligandos podem ser, *v.g.*, proteínas, péptidos, imunoadesinas, anticorpos ou outros compostos orgânicos.

As proteínas podem ser, por exemplo, uma proteína de fusão do ligando com outra proteína, facultativamente ligada por um ligador peptídico. Uma tal proteína de fusão pode aumentar o tempo de retenção do ligando no corpo e por tal motivo pode mesmo permitir que o complexo ligando-proteína seja utilizado como agente latente ou como vacina.

O termo "proteínas" procura abranger as muteínas e as proteínas fundidas, os seus sais, os seus derivados funcionais e as suas fracções activas.

O termo "muteínas" aqui utilizado refere-se aos análogos das proteínas, dos péptidos e quejandos, em que um ou vários dos resíduos aminoácidos da proteína, para a qual se concluiu que se liga, são substituídos por resíduos aminoácidos diferentes ou são suprimidos, ou em que um ou vários resíduos aminoácidos são acrescentados à sequência original, sem modificar de forma considerável a actividade do produto resultante. Estas muteínas são preparadas por técnicas conhecidas de síntese e/ou de mutagénese dirigida ao local, ou por meio de quaisquer outras técnicas adequadas para o efeito.

A expressão "proteína fundida" designa um polipeptido que compreende os ligandos ou uma sua muteína fundida com outra proteína que tenha um maior tempo de residência nos fluidos corporais. Assim, os ligandos podem ser fundidos com outra proteína, outro polipeptido ou quejandos, *v.g.*, uma imunoglobulina ou um seu fragmento.

O termo "sais" aqui utilizado refere-se tanto aos sais de grupos carboxilo como aos sais de grupos amino dos ligandos obtidos por adição de ácidos, às suas muteínas e às suas proteínas fundidas. Os sais com um grupo carboxilo podem ser formados por métodos conhecidos na especialidade e compreendem os sais inorgânicos, por exemplo, os sais de sódio, cálcio, amónio, férricos, ou de zinco e outros que tais, e também os sais com bases orgânicas, tais como aqueles que são formados, por exemplo, com aminas, tais como tri-etanolamina, arginina ou lisina, piperidina, procaína e não só. Os sais de adição de ácidos compreendem, por exemplo, os sais obtidos com ácidos minerais tais como, por exemplo, o ácido clorídrico ou o ácido sulfúrico, e os sais obtidos com ácidos orgânicos tais como, por exemplo, o ácido acético ou o ácido oxálico.

A expressão "derivados funcionais" aqui utilizada abrange os derivados dos ligandos e suas muteínas e proteínas fundidas, os quais podem ser preparados a partir de grupos funcionais que ocorram como cadeias laterais nos resíduos ou nos grupos dos terminais N ou C, por meio de técnicas conhecidas na especialidade, e consideram-se abrangidos na presente invenção desde que sejam farmaceuticamente aceitáveis, isto é, não destruam a actividade do ligando e não transmitam propriedades tóxicas às composições que os contenham. Por exemplo, tais derivados podem conter cadeias laterais de polietileno-glicol que podem dissimular os locais antigénicos e aumentar o tempo de residência dos ligandos nos fluidos corporais. Como exemplos de outros derivados refere-se os ésteres alifáticos dos grupos carboxílicos, as

amidas dos grupos carboxílicos obtidas por reacção com amónia ou com aminas primárias ou secundárias, os derivados N-acilados dos grupos amino livres dos resíduos aminoácidos formados com resíduos acilo (*v.g.* grupos alcanoílo ou grupos aroílo carbocíclicos) ou os derivados O-acilados de grupos hidroxilo livres (por exemplo, os de resíduos serilo ou treonilo) formados com resíduos acilo.

No que diz respeito às "fracções activas" dos ligandos, suas proteínas fundidas e suas muteínas, a presente invenção abrange todos os fragmentos ou precursores da cadeia polipeptídica do ligando, por si só ou conjuntamente com moléculas associadas, ou os resíduos que lhe estejam ligados, *v.g.*, resíduos açúcar ou fosfato, ou os agregados da molécula proteica ou os resíduos açúcar por si próprios, desde que a referida fracção tenha a mesma actividade biológica e/ou farmacêutica.

Os péptidos compreendem os substitutos com pontes peptídicas e/ou os simuladores peptídicos, isto é, pseudopeptidos, conforme é sabido na especialidade (ver *v.g.* E. Bayer, pp. 289-336) e também os sais e preparações e/ou formulações farmacêuticas que façam com que os péptidos bioactivos sejam particularmente adequados para administração oral, tópica, aspersão nasal, ocular, pulmonar ou pelas vias i.v. ou subcutânea, consoante o tratamento particular indicado. Tais sais, formulações, substitutos de aminoácidos e estruturas pseudopeptídicas podem ser necessários e desejáveis para aumentar a estabilidade, a simplicidade de formulação, o potencial de administração (*v.g.*, composições de libertação lenta, profármacos), ou para aumentar a economia de produção, desde que não afectem prejudicialmente a actividade biológica do péptido.

Para além das substituições, é possível mencionar concretamente três formas particulares de estruturas análogas e/ou miméticas de péptidos com particular importância ao conceber

péptidos bioactivos que tenham de se ligar a um receptor e tenham de enfrentar simultaneamente o risco de degradação por acção de proteinases e peptidases existentes no sangue, nos tecidos e noutros locais, sendo tais formas ilustradas pelos exemplos a seguir descritos. Em primeiro lugar, a inversão dos centros quirais da armação, que conduz às estruturas de resíduos amino-ácidos D, pode proporcionar, em particular no terminal N, uma melhor estabilidade contra a degradação proteolítica, sem afectar prejudicialmente a actividade. Há um exemplo disto que vem descrito no documento "Tritriated D-ala^1-peptide T Binding", Smith C.S. *et al.*, Drug Development Res. 15, pp. 371-379 (1988). Em segundo lugar, a estrutura cíclica que confere estabilidade, por exemplo, as imidas e as lactamas da cadeia interna de N para C (Ede *et al*, em Smith and Rivier (Eds.) "Peptides: Chemistry and Biology, Escom, Leiden (1991), pp. 268-270) e por vezes também a ligação ao receptor podem ser melhoradas para formar análogos cíclicos. Há um exemplo disto que vem descrito na patente de invenção norte-americana n° 4 457 489 (1985) de Goldstein, G. *et al.*. Em terceiro lugar, a introdução de pontes cetometileno, sulfureto de metilo ou de pontes retroinversas para substituir as ligações peptídicas, isto é, a troca dos radicais CO e NH, vai provavelmente aumentar também tanto a estabilidade como a potência. Há um exemplo deste tipo que vem descrito no documento "Biologically active retroinverse analogues of thymopentin", Sisto A. *et al.*, em Rivier, J.E. e Marshall, G.R. (eds) "Peptides, Chemistry, Structure and Biology", Escom, Leiden (1990), pp. 722-773).

Os péptidos da presente invenção podem ser sintetizados por diversos métodos que, em principio, são conhecidos, designadamente por métodos de acoplamento químico ((cf. Wunsch, E: "Methoden der Organischen Chemie", Volume 15, Band 1 + 2, Synthese von Peptiden, Thime Verlag, Estugarda, (1974), e Barrany, G.; Marrifield, R.B.: "The peptides", eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Capítulo 1, pp. 1-284, Academic Press (1980)), ou

por métodos de acoplamento enzimático (cf. Widmer, F. Johansen, J.T., Carlberg Res. Commun., Vol. 44, pp. 37-46 (1979), e Kullmann, W.: "Enzymatic Peptide Synthesis" CRC Press Inc. Boca Raton, Fl. (1987), e Widmer, F.; Johansen, J.T. em "Synthetic peptides in Biology and Medicines; eds. Alitalo, K., Partanen, P., Vatieri, A., pp. 79-86, Elsevier, Amsterdam (1985)) ou por meio de uma combinação de métodos químicos e enzimáticos se isso for vantajoso por razões de economia e concepção do processo.

É possível acrescentar um resíduo cisteína tanto no terminal amino como no terminal carboxi do péptido, o que vai permitir a ciclização do péptido graças à formação de uma ponte dissulfureto.

Todas as modificações dos péptidos da presente invenção que não tenham como resultado uma diminuição da sua actividade biológica estão abrangidas no âmbito da presente invenção.

Há inúmeros exemplos que ilustram a capacidade que têm os anticorpos anti-idiotípicos (Ac-anti-Id) contra um antigénio para funcionarem tal como esse antigénio na sua interacção com células e componentes de células de animais. Assim sendo, os Ac anti-Id contra um antigénio hormonal peptídico podem ter actividade de tipo hormonal e podem interactuar especificamente com um mediador de forma idêntica à que tem lugar com o receptor. (Para um estudo destas propriedades ver: Gaulton, G.N e Greane, M.I. 1986. 'Idiotypic mimicry of biological receptors', Ann. Rev. Immunol. Vol. 4, pp. 253-280; Sege K. e Peterson, P.A., 1978, 'Use of anti-idiotypic antibodies as cell surface receptor probes', Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 75, pp. 2443-2447).

A partir desta semelhança funcional entre um Ac anti-Id e o antigénio, admite-se que os Ac anti-Id portadores da imagem interna de um antigénio possam induzir imunidade contra

tal antigénio (ver o estudo de Hiernaux, J.R., 1988, 'Idiotypic vaccines and infectious diseases', Infect. Immun., Vol., 56, pp. 1407-1413).

Assim, é possível produzir anticorpos anti-idiotípicos, contra os péptidos das presente invenção, que irão ter uma actividade biológica semelhante.

Em consequência, a presente invenção também proporciona anticorpos anti-idiotípicos contra os péptidos da presente invenção, sendo tais anticorpos anti-idiotípicos capazes de inibir a toxicidade do FNT mas não a sua ligação ao receptor.

A especificidade de cada anticorpo reside nas estruturas dos elos peptídicos que fazem parte das regiões determinantes da complementaridade (RDC) dos domínios variáveis dos anticorpos. Em geral, uma vez que a sequência de aminoácidos dos péptidos da RDC de um Ac anti-Id não é idêntica nem mesmo semelhante à sequência de aminoácidos do antigénio peptídico a partir do qual foi originariamente obtida, infere-se que os péptidos cuja sequência de aminoácidos seja bastante dissemelhante, em determinados contextos, podem assumir uma estrutura tridimensional bastante semelhante. O conceito deste tipo de péptido, ao qual Geyson atribuiu a designação de "sequência funcionalmente equivalente" ou mimotopo, é já conhecido. (Geyson, H.M *et al.*, 1987, 'Strategies for epitope analysis using peptide synthesis' J. Immun. Methods, Vol. 102, pp. 259-274).

Além do mais, a estrutura tridimensional e a actividade dos péptidos biologicamente activos podem ser simuladas por outros compostos, alguns deles não sendo mesmo de natureza peptídica, mas que imitem contudo a actividade de tais péptidos. Esta matéria está resumida num estudo de Goodman, M. (1990), (Synthesis, Spectroscopy and computer simulations in peptide research, "Proc. 11th American Peptide Symposium" publicado em 'Peptides--Chemistry, Structure and Biology', pp. 3-29; Eds. Rivier, J.E. e Marshall, G.R. Publisher Escom).

Também é possível produzir compostos peptídicos e não peptídicos que possuam a mesma estrutura tridimensional dos péptidos da presente invenção. Estas "estruturas funcionalmente equivalentes" ou "simulacros peptídicos" vão reagir com os anticorpos criados contra o péptido da presente invenção e também podem ser capazes de inibir a toxicidade do FNT.

Em consequência, de acordo com outra das suas variantes, a presente invenção proporciona um composto cuja estrutura tridimensional é semelhante, enquanto farmacóforo, à estrutura tridimensional dos péptidos da presente invenção, sendo tal composto caracterizado pelo facto de reagir com anticorpos criados contra os péptidos da presente invenção e pelo facto de ser capaz de inibir a toxicidade do FNT.

É possível encontrar mais pormenores sobre farmacóforos nos trabalhos de Bolin *et al.*, p. 150, Polinsky *et al.*, p. 287 e Smith *et al.*, p. 485, *in* Smith e Rivier (eds.) "Peptides: Chemistry and Biology", Escom, Leiden (1991).

Todas estas moléculas (proteínas, péptidos, etc.) podem ser produzidas por métodos químicos convencionais, conforme aqui descrito, ou por métodos tecnológicos do ADN recombinante.

A invenção proporciona também moléculas de ADN que codificam os ligandos de acordo com a invenção, os vectores que os contêm e as células hospedeiras que compreendem tais vectores e que sejam capazes de exprimir os ligandos de acordo com a invenção.

A célula hospedeira pode ser procariótica ou eucariótica.

A invenção proporciona ainda moléculas de ADN que hibridam com as moléculas de ADN referidas *supra* e que codificam os ligandos que possuam a mesma actividade.

A invenção também proporciona composições farmacêuticas que incorporem os ligandos referidos *supra* e que sejam úteis para tratar doenças induzidas ou provocadas pelos efeitos do FNT, quer este seja produzido endogenamente quer seja administrado exogenamente.

A invenção proporciona ainda a utilização de ligandos de acordo com a invenção para aumentar o efeito inibidor de um receptor solúvel pertencente à família de receptores de FNT/FCN. Conforme explicitado antes, os receptores solúveis, especialmente os receptores do FNT, possuem capacidade para bloquear a função do FNT, graças ao facto de se ligarem a ele em competição com os receptores superficiais. Posto isto, presume-se que a aplicação de um ligando de acordo com a invenção, conjuntamente com um receptor solúvel, venha a aumentar o efeito inibidor do receptor solúvel.

A figura 1 mostra os resultados da experiência que permitiu cartografar o epítopo 67.

A figura 2 mostra a sequência nucleotídica e a sequência deduzida de aminoácidos do receptor p75. Os domínios TBP-II e transmembranar estão marcados por uma esquadria rectangular e por uma esquadria sombreada. A região reconhecida pelos anticorpos do grupo 67 está sublinhada e a região reconhecida pelos anticorpos anti-região pedunculada está sublinhada por uma linha a traço interrompido.

A figura 3 mostra o efeito inibidor dos anticorpos do grupo 67 e dos anticorpos anti--região pedunculada sobre a actividade do FNT em células HeLa.

A figura 4 mostra que os anticorpos contra a parte superior do domínio extracelular do p75 R-FNT são sinalizantes nas células HeLa.

A figura 5 mostra que os anticorpos contra a parte superior do domínio extracelular do p75 R-FNT não são sinalizantes em células A9 que exprimam o p75 R-FNT humano. Contudo, os anticorpos do grupo 67 possuem realmente um efeito inibidor sobre a actividade que neles tem o FNT (figura 6).

A figura 6 mostra que os anticorpos contra a parte superior do domínio extracelular do p75 R-FNT inibem a função do FNT nas células A9.

A figura 7 mostra que os anticorpos contra a parte superior do domínio extracelular do p75 R-FNT não sinalizam em células A9 que exprimam o p75 R-FNT citoplasmicamente truncado. No entanto, os anticorpos do grupo 67 possuem realmente um efeito inibidor sobre a actividade que neles tem o FNT (não representado).

A figura 8 mostra que os anticorpos contra o epítopo 67 dificultam a dissociação do FNT a partir do p75 R-FNT.

A figura 9 ilustra a homologia sequencial entre diversos elementos da família de receptores de FNT/FCN.

O FNT, conforme indicado antes, é uma citoquina que inicia o seu efeito sobre a função celular mediante a ligação de dois receptores específicos da superfície da célula: os receptores p55 e p75. A ligação de anticorpos ao domínio extracelular destes receptores pode interferir com o seu efeito. No entanto, conforme comprovado em diversos estudos, os anticorpos que se ligam ao domínio extracelular dos receptores também podem desencadear os efeitos do FNT mediante a indução da agregação dos receptores p55 e também mediante a indução da agregação dos receptores p75. (Engelmann, *et al.*, J. Biol. Chem., Vol. 265, N° 24, pp. 14497-14504, 1990; e dados não publicados).

Conforme descrito no pedido de patente de invenção europeia n° EP-A2-0 585 939, os anticorpos que se ligam a uma região particular no receptor p75 não são miméticos mas sim inibidores da sinalização para o efeito citocida por acção deste receptor. Isto assim é, apesar do facto de estes anticorpos, quando se ligam a esta região, não só não bloquearem a ligação do FNT como ainda a aumentarem com uma certa amplitude. No pedido de patente de invenção n° 106271 esta região está identificada mais particularmente como sendo o fragmento que vai desde o resíduo cis-163 até ao resíduo thr-179, no quarto domínio do receptor rico em

cisteína. A presente invenção revela que a região reconhecida por determinados anticorpos é a região que se prolonga para jusante do resíduo thr-181 e para montante do resíduo cis-163 até próximo do resíduo cis-142 no domínio extracelular do receptor p75.

A presente invenção também esclarece que o chamado "anticorpo contra a região peduncular" reconhece uma região a jusante do quarto domínio rico em cisteína, mais particularmente a região que vai sensivelmente desde o aminoácido 181 até junto do aminoácido 235.

Descobriu-se também, de acordo com a presente invenção, que no caso dos anticorpos do "epítopo 67", os anticorpos bivalentes têm um efeito que imita a acção do FNT, ao passo que os fragmentos monovalentes, tais como o F(ac), inibem os efeito citotóxico do FNT.

Com base nestes resultados, é possível definir compostos de pequeno peso molecular, tais como péptidos ou compostos miméticos, que irão inibir a actividade do receptor p75 ou aumentá-la.

Tendo em conta estas conclusões, e levando ainda em consideração a estreita semelhança dos receptores desta família particular, a presente invenção refere-se também aos ligandos que se ligam às mesmas regiões no domínio extracelular dos diversos membros da família de receptores de FNT/FCN e que modulam a actividade dos outros receptores, de forma semelhante à modulação da actividade do FNT. Nesta família de receptores a localização das cisteínas no domínio extracelular e o seu afastamento são fortemente conservados. Há determinados elementos desta família, *v.g.* o CDw40, que manifestam particularmente uma semelhança elevada com o receptor p75. Em particular, em tais receptores, presume-se que os ligandos que se ligam a essas regiões tenham efeitos semelhante ao efeito dos ligandos de acordo com a presente invenção no receptor p75.

A produção recombinante dos ligandos tem lugar por métodos conhecidos, vulgarmente utilizados na especialidade.

Seguidamente ilustra-se a invenção por meio de exemplos não limitativos.

EXEMPLO 1: cartografia do epítopo 67 do p75 R-FNT

a) Para se comparar a função dos anticorpos do grupo 67 não só com os anticorpos que se ligam ao receptor na região do epítopo 67, mas também com os anticorpos que se ligam ao receptor a jusante dessa região do epítopo, procedeu-se à imunização de coelhos com um arquétipo quimérico correspondente à região que se prolonga para jusante até ao epítopo 32 (aminoácidos 181 a 235; a região "peduncular"), ligado ao MBP. Os coelhos desenvolveram anticorpos que se ligam ao arquétipo quimérico com o qual foram imunizados, e também ao receptor p55 intacto do FNT. Estes anticorpos foram purificados por afinidade, mediante a ligação à proteína quimérica, aplicada a uma coluna de 'Affigel 10', e testou-se o seu efeito sobre a actividade do FNT e respectiva ligação. (A preparação de anticorpos purificados por afinidade recebeu a designação "318").

b) Efectuou-se a cartografia do epítopo 67 examinando a capacidade dos anticorpos nº 67 e 13 (um anticorpo que se liga à parte superior do domínio extracelular do p75 R-FNT) e também do anti-soro 318, para realizarem a imunoprecipitação dos seguintes mutantes solúveis de p75 R-FNT marcados com metionina: WT - um receptor que vai desde o aminoácido 22 até ao aminoácido 234; D4D - um receptor idêntico ao WT, no qual foi suprimido o quarto domínio rico em cisteína (aminoácidos 141 a 180). Os receptores foram produzidos transcrevendo *in vitro* os ADNc que os codificam (a partir do vector 'Bluescript', utilizando o promotor T7), seguindo-se a tradução *in vitro* utilizando para tal os estojo "Promega TnT". As proteínas

imunoprecipitadas foram analisadas por EGPA-DSS (o mesmo que SDS-PAGE) e depois por autorradiografia. (A) Imunoprecipitação do WT. Todos os anticorpos foram eficazes. (B) Imunoprecipitação do D4D. Apenas os anticorpos 13 e 318 foram eficazes. Os resultados indicam que o epítopo 67 está localizado na parte superior do quarto domínio rico em cisteína, dentro da região definida pelos aminoácidos 141 a 180.

EXEMPLO 2: titulação do efeito inibidor dos anticorpos do grupo 67 e dos anticorpos anti--região peduncular sobre a função do FNT

Conforme se observa na figura 3, descobriu-se que o efeito protector dos diversos anticorpos estudados, no que diz respeito ao efeito citocida do FNT sobre as células HeLa p75.3, variava em função do anticorpo particular utilizado: os anticorpos 32 e o anti-soro 318 e os seus fragmentos monovalentes Fac que são protectores, o anticorpo 67 que é protector na sua forma de fragmento monovalente Fac e que aumenta a toxicidade do FNT na sua forma divalente, e ainda o anticorpo 13 (que se liga à parte superior do domínio extracelular do p75-R) que aumenta o efeito citocida do FNT (as células p75.3 são células HeLa transfectadas com o receptor p75 R-FNT de comprimento completo).

EXEMPLO 3: o efeito inibidor dos anticorpos do grupo 67 e dos anticorpos anti-região peduncular é independente da expressão e da função do domínio intracelular do p75 R-FNT

Nas células HeLa que sobreexprimem o p75 R-FNT, os anticorpos contra a parte superior do domínio extracelular do receptor têm um efeito citocida, cinérgico com o efeito dos anticorpos contra o p55-R (figura 4). No entanto, estes anticorpos não têm tal efeito nas células A9 que exprimem o p75 R-FNT humano, quer de comprimento completo quer citoplasmicamente

truncado (respectivamente as figuras 5 e 7). Contudo, os anticorpos que se ligam à parte inferior do receptor revelaram realmente um efeito inibidor sobre a actividade do FNT, mesmo nessas células, independentemente do facto de as células exprimirem o receptor de comprimento completo ou o receptor citoplasmicamente truncado (ver a figura 6 e também dados não apresentados).

EXEMPLO 4: efeito dos diversos anticorpos sobre a dissociação do FNT a partir do p75 R-FNT

A figura 8 ilustra uma comparação da taxa de dissociação do FNT a partir do p55 R-FNT, conforme avaliado por medição da dissociação do FNT, marcado radioactivamente, a partir de células A9 de murganho que exprimem o p55 R-FNT humano transfectado (células A9D2 em que mais de 90% do FNT ligado às células está associado ao p55 R-FNT humano) e a partir das células HeLa p75.3 em que a maior parte do FNT ligado está associado ao p75 R-FNT sobreexpresso. Contrariamente à dissociação muito lenta do FNT a partir do p55 R-FNT, o FNT dissocia-se muito mais rapidamente a partir do p75 R-FNT.

A figura 8 também ilustra o efeito dos anticorpos que se ligam às diversas regiões na parte de baixo do domínio extracelular do p75 R-FNT sobre a dissociação do FNT a partir do receptor: demonstrou-se que o anticorpo 32 (que se liga ao "epítopo 32") e também os seus fragmentos monovalentes Fac, o anticorpo 67 que se liga ao epítopo 67 e ainda o anti-soro 318, produzido em presença da região "peduncular" na parte de baixo do domínio extracelular, dificultam todos eles a dissociação do FNT a partir do receptor.

EXEMPLO 5

A figura 9 mostra os fragmentos repetitivos internos ricos em cisteína nos domínios extracelulares dos dois R-FNT e os seus alinhamentos com os fragmentos repetitivos homólogos

no domínio extracelular do FAS, do receptor do factor de crescimento dos nervos (FCN) e do CDw40 e também no Ox40 do rato. As sequências de aminoácidos (símbolos de uma letra) estão alinhadas de modo a realçar a máxima homologia. As posições dos aminoácidos dentro dos receptores estão assinaladas na margem esquerda.

Informação sobre o depósito de registo

Os hibridomas TBP-II 67 e 81 foram depositados na Colecção Nacional de Culturas de Microrganismos, Instituto Pasteur (CNCM) em 11 de Outubro de 1993, tendo-lhes sido atribuídos respectivamente os n^{os} I-1368 e I-1369.

Lisboa, 5 de Junho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua do Salitre, 105, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Reivindicações

1. Ligando para um membro da família de receptores de FNT/FCN, o qual se liga quer à região do quarto domínio rico em cisteína de um tal receptor quer à região entre ele e a membrana celular.

2. Ligando de acordo com a reivindicações 1, em que o quarto domínio rico em cisteína possui a sequência de aminoácidos que vai desde o resíduo pro-141 até ao resíduo thr-179 no p75 R-FNT, ou uma região correspondente noutro membro da família de receptores de FNT/FCN.

3. Ligando de acordo com a reivindicação 2, em que o quarto domínio rico em cisteína compreende a sequência de aminoácidos que vai desde o resíduo cis-163 até ao resíduo pro-141 no p75 R-FNT, ou uma região correspondente noutro membro da família de receptores de FNT/FCN.

4. Ligando de acordo com a reivindicação 1, em que a região entre o quarto domínio rico em cisteína e a membrana celular compreende a sequência que vai desde o resíduo thr-179 até à extremidade do domínio extracelular do p75 R-FNT, ou uma região correspondente noutro membro da família de receptores de FNT/FCN.

5. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações anteriores, o qual é um ligando para um R-FNT.

6. Ligando de acordo com a reivindicação 5, em que o receptor é o p75 R-FNT.

7. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, o qual compreende a sequência de aminoácidos para a região RDC da cadeia pesada do anticorpo monoclonal nº 67 (CNCM - I-1368) e/ou a sua cadeia leve.

8. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, o qual compreende a sequência de aminoácidos para a região RDC da cadeia pesada do anticorpo monoclonal nº 81 (CNCM - I-1369) e/ou a sua cadeia leve.

9. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 3, o qual compreende uma sequência de aminoácidos e um anticorpo criado contra o domínio rico em cisteína de um membro da família de receptores de FNT/FCN.

10. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, o qual compreende uma proteína.

11. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, o qual compreende um péptido.

12. Ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 9, cuja estrutura tridimensional é semelhante, enquanto farmacóforo, à estrutura tridimensional da proteína

ou do péptido de acordo com as reivindicações 10 e 11, sendo ainda capaz de inibir o efeito do FNT mas não a sua ligação ao R-FNT.

13. Molécula de ADN que codifica um ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12, capaz de exprimir tal ligando.

14. Molécula de ADN que hibrida com uma molécula de ADN de acordo com a reivindicação 13 e que é capaz de exprimir um ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12.

15. Veículo de expressão replicável que compreende uma molécula de ADN de acordo com uma qualquer das reivindicações 13 ou 14 e que é capaz de exprimir, numa célula hospedeira transformante, um ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12.

16. Célula hospedeira transformada com o veículo de expressão replicável de acordo com a reivindicação 15.

17. Célula hospedeira procariótica de acordo com a reivindicação 16.

18. Célula hospedeira eucariótica de acordo com a reivindicação 16.

19. Processo para a produção de um ligando recombinante de acordo com uma qualquer das reivindicações a 1 a 12, o qual consiste em criar em cultura uma célula hospedeira transformada de acordo com a reivindicação 16 e em recuperar o ligando recombinante.

20. Composição farmacêutica que compreende um ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12.

21. Anticorpo anti-idiotípico para um ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12, capaz de inibir o efeito do FNT mas não a sua ligação ao R-FNT.

22. Utilização de um ligando de acordo com uma qualquer das reivindicações 1 a 12, para a produção de uma composição farmacêutica para aumentar o efeito inibidor de um receptor solúvel da família de receptores de FNT/FCN.

Lisboa, 5 de Junho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.C.P.I.
Rua do Salitre, 195, r/c-Drt.
1250 LISBOA

Resumo

"Inibidores do FNT"

A invenção descreve ligandos para os receptores do Factor da Necrose Tumoral (R-FNT), os quais inibem o efeito do FNT mas não a sua ligação aos R-FNT, e descreve também os ligandos que interactuam com os outros receptores da família de receptores de FNT/FCN, descrevendo ainda os métodos para a sua produção.

Lisboa, 5 de Junho de 2000

O Agente Oficial da Propriedade Industrial

JOSÉ DE SAMPAIO
A.O.P.I.
Rua de Salitre, 195 r/c-Drt.
1250 LISBOA

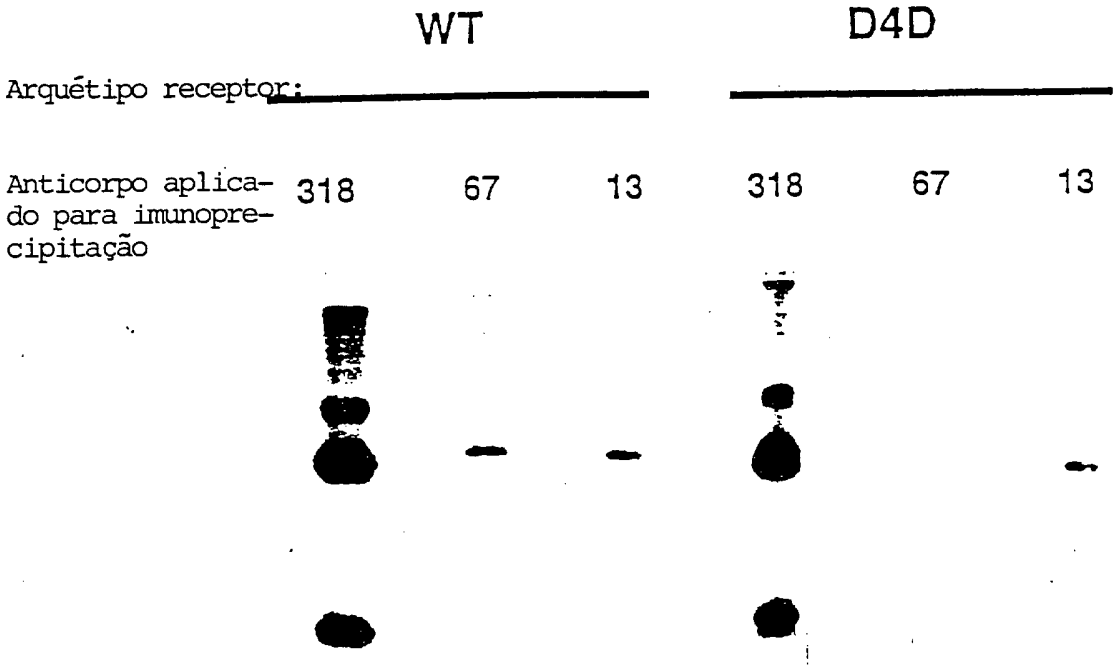

WT
D4D
Arquétipo receptor:
Anticorpo aplicado para imunoprecipitação
318
67
13
318
67
13

Figura 1

258

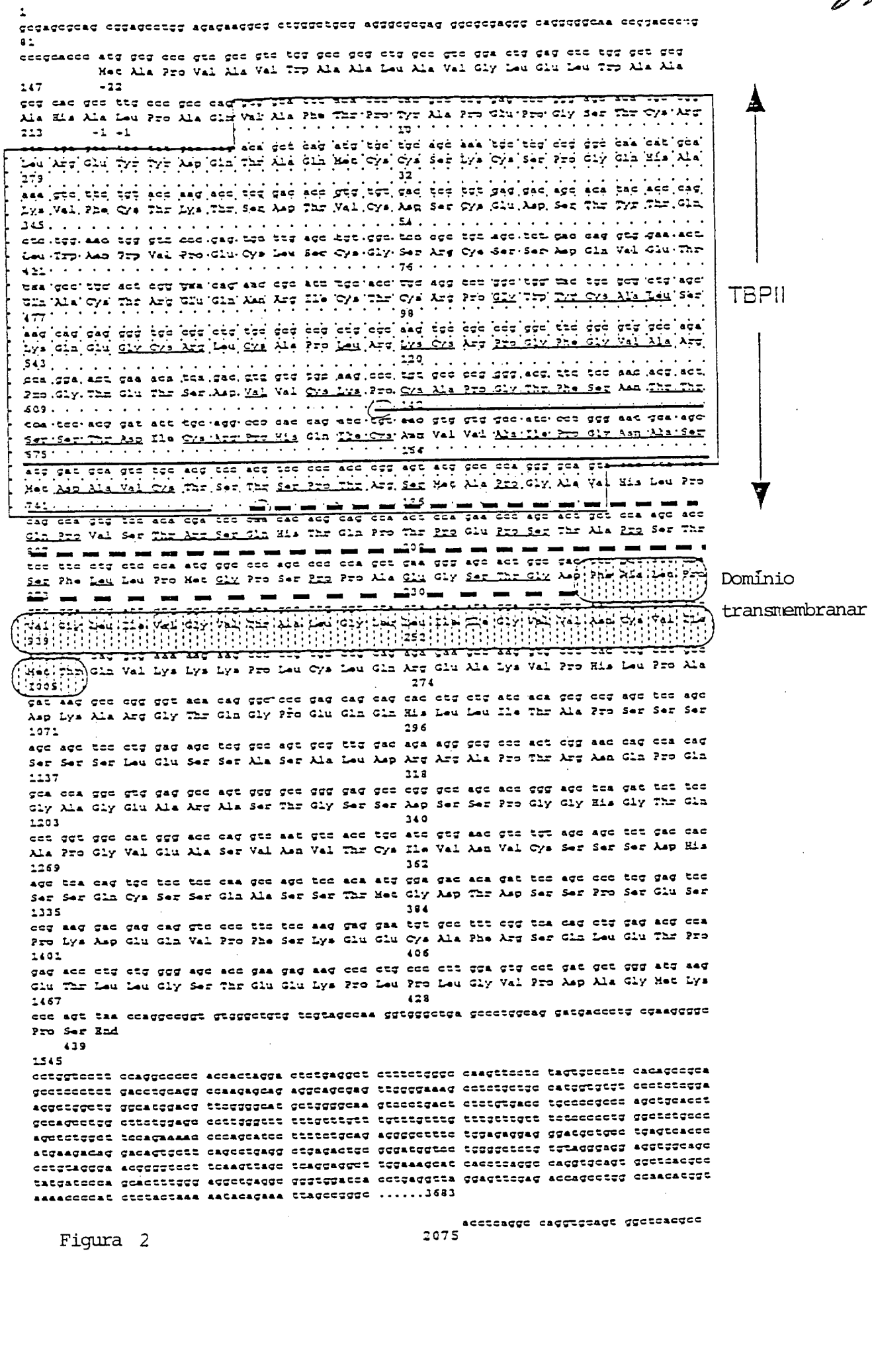


Figura 2

258

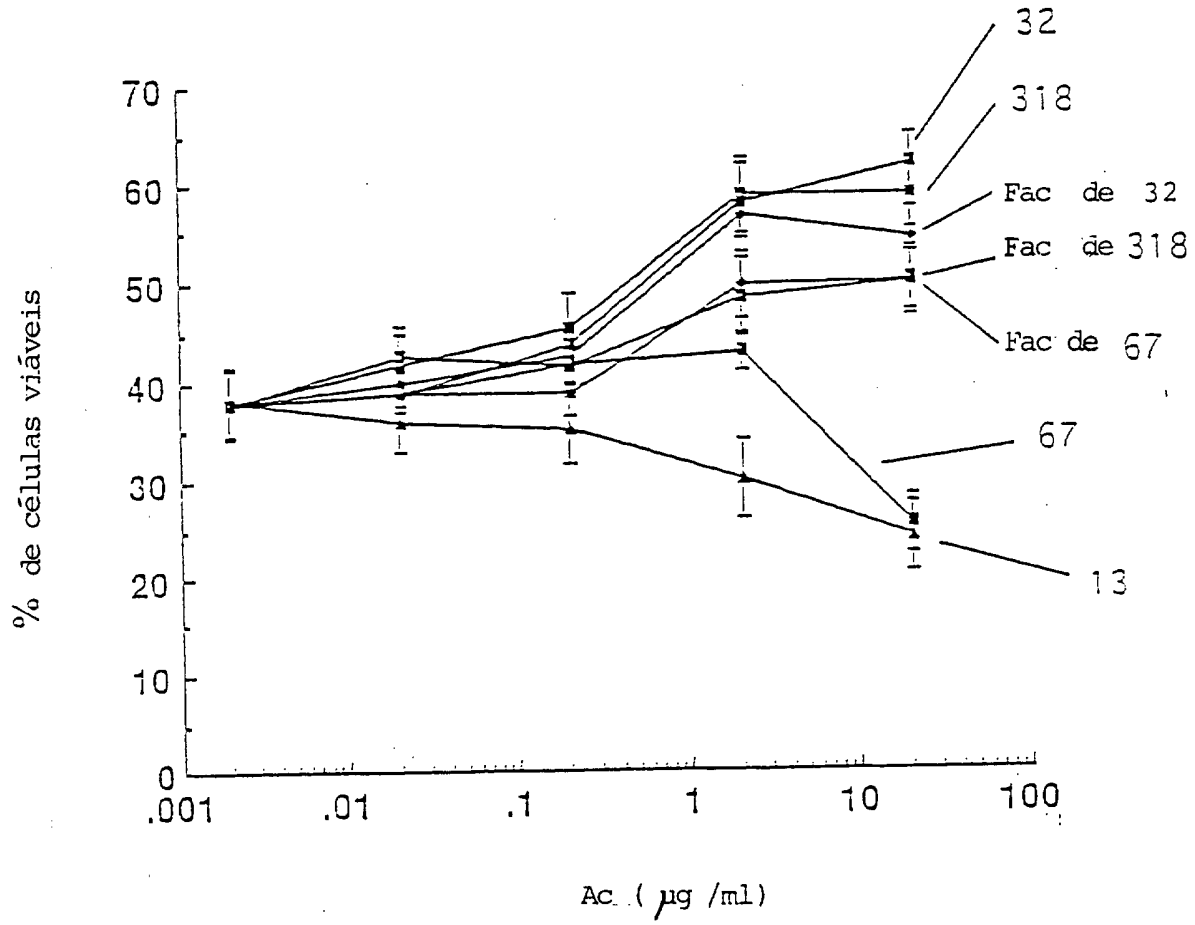

32
318
Fac de 32
Fac de 318
Fac de 67
67
13
70
60
50
40
30
20
10
0
.001
.01
.1
1
10
100
% de células viáveis
Ac. (µg /ml)

Figura 3

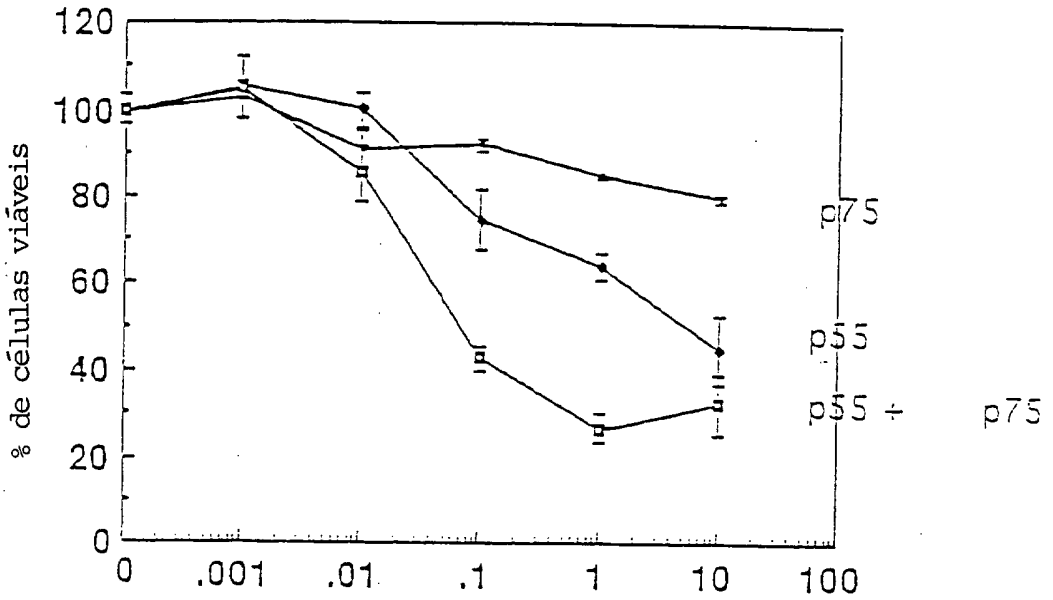

120
100
80
60
40
20
0
% de células viáveis
0
.001
.01
.1
1
10
100
p75
p55
p55 + p75
Anticorpos (Ac) (µg/ml)

Figura 4

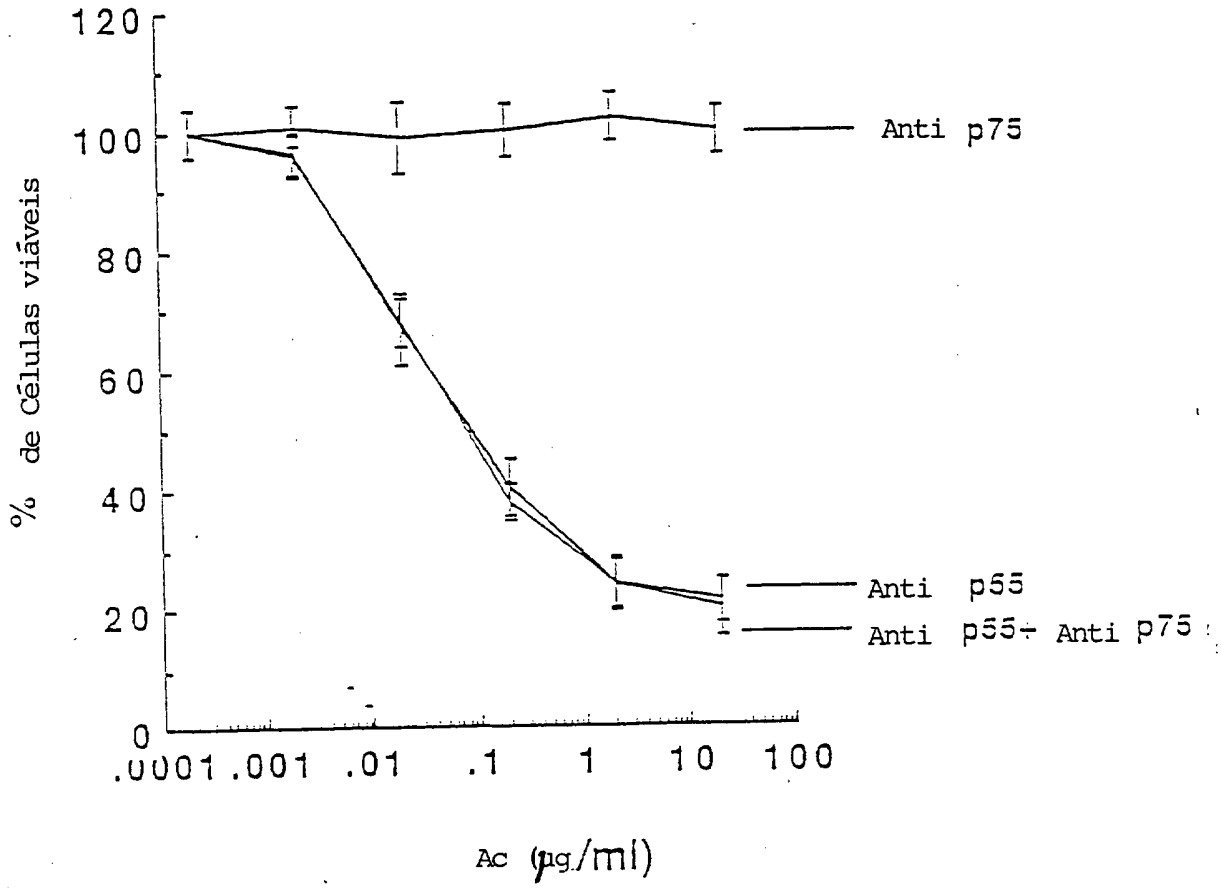

120
100
80
60
40
20
0
% de Células viáveis
.0001 .001 .01 .1 1 10 100
Ac (µg/ml)
Anti p75
Anti p55
Anti p55+ Anti p75

Figura 5

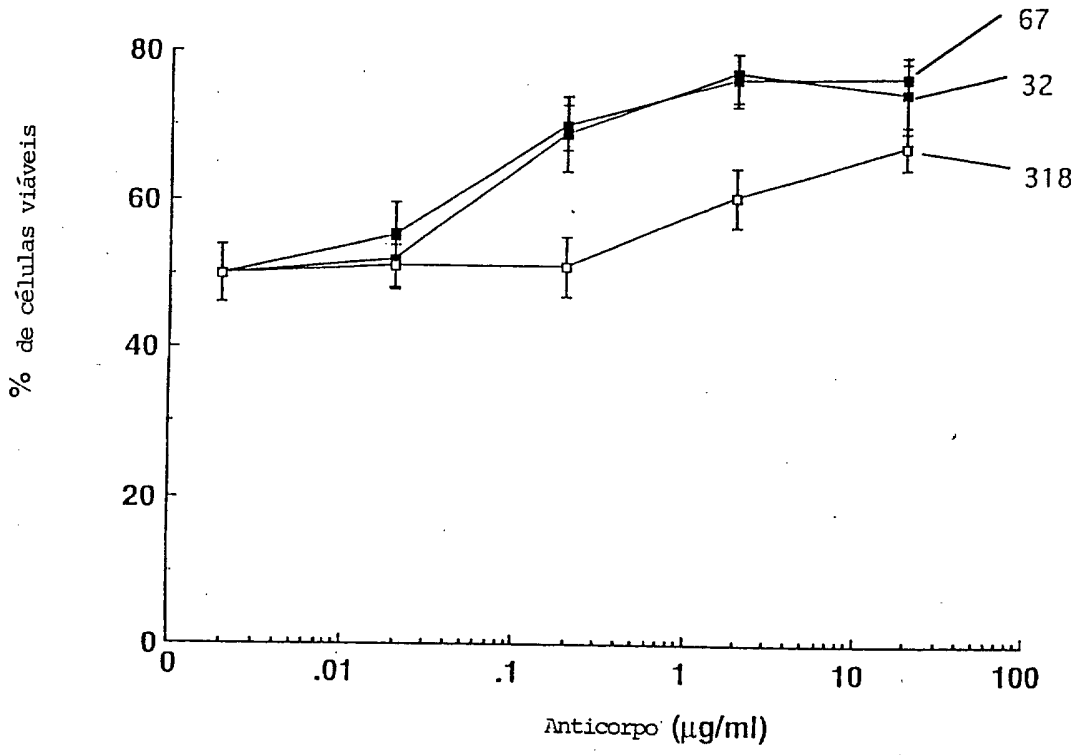

67
32
318
80
60
40
20
0
0
.01
.1
1
10
100
% de células viáveis
Anticorpo (µg/ml)

FIGURA 6

258

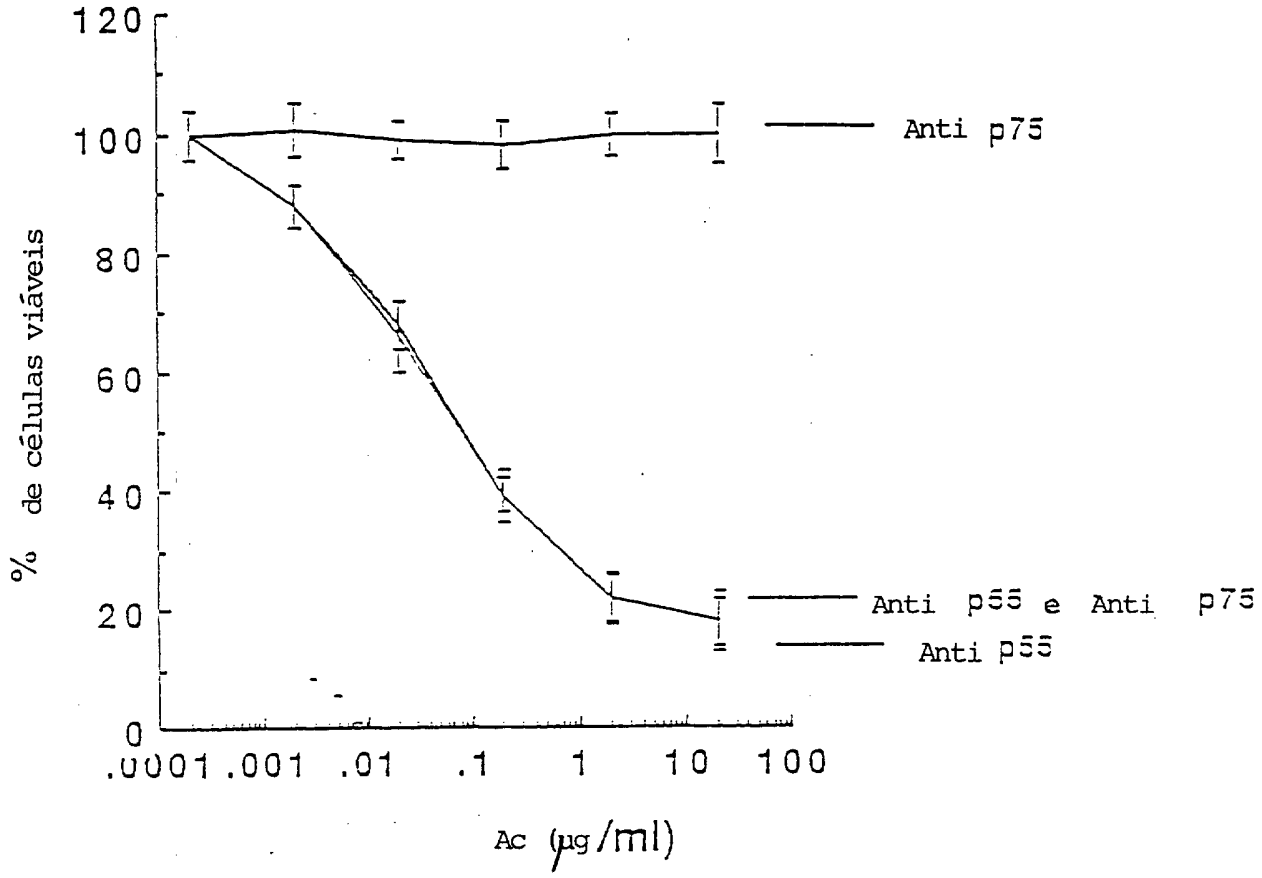

120
100
80
60
40
20
0
% de células viáveis
.0001 .001 .01 .1 1 10 100
Ac (µg/ml)
Anti p75
Anti p55 e Anti p75
Anti p55

Figura 7

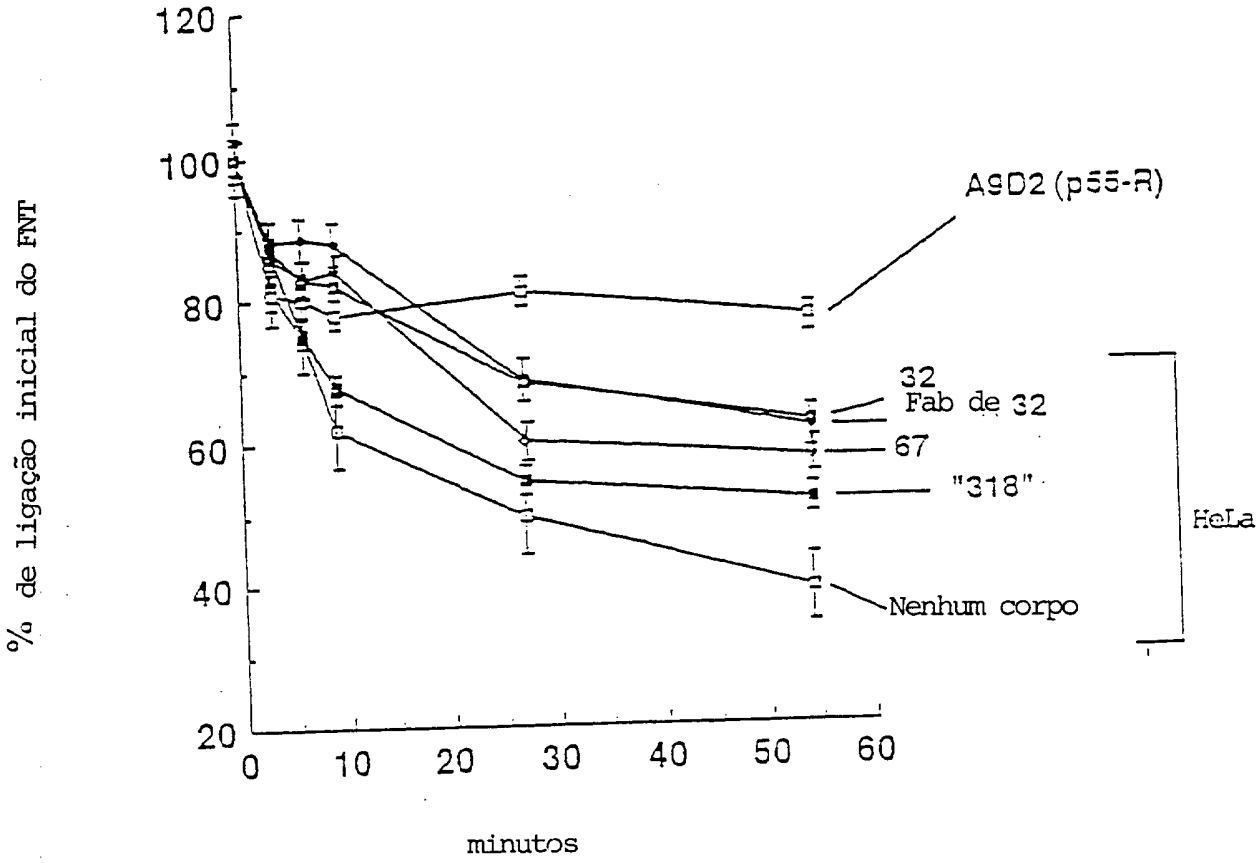

120
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
% de ligação inicial do FNT
minutos
A9D2 (p55-R)
32
Fab de 32
67
"318"
Nenhum corpo
HeLa

Figura 8

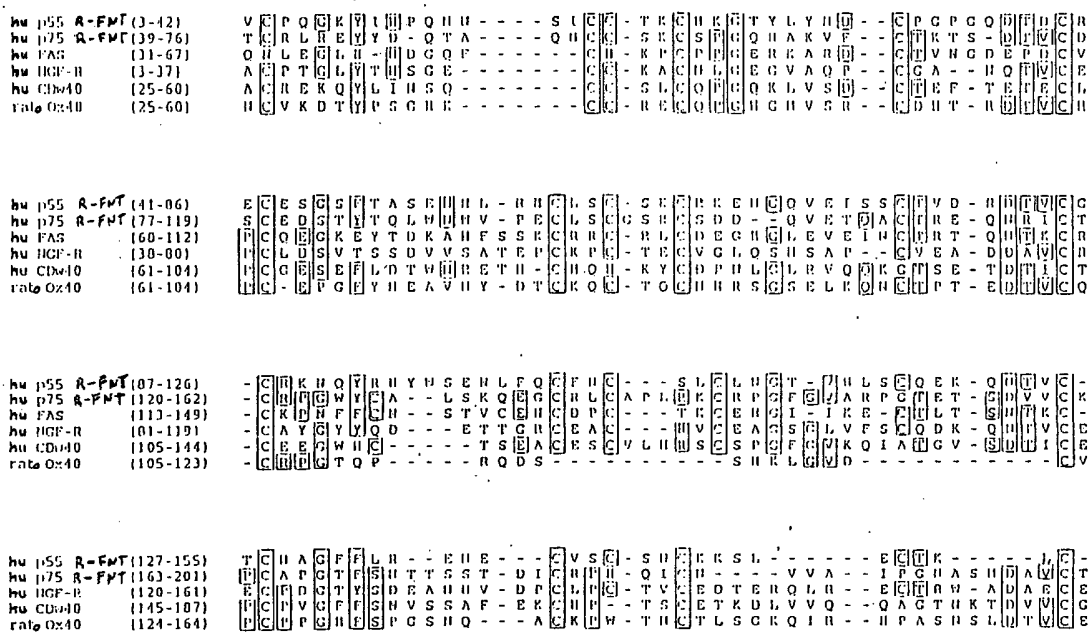


Figura 9