

(11) **Número de Publicação: PT 671946 E**

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

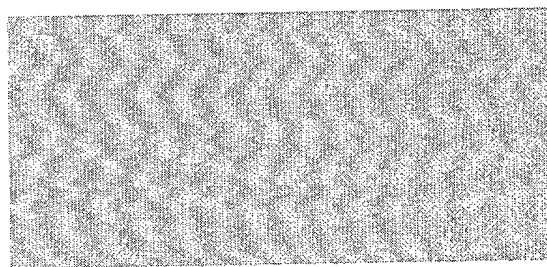
C07K007/08 A C07K014/05 B  
 A61K038/10 B A61K039/245 B  
 C12N005/12 B C12N015/38 B

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) <b>Data de depósito:</b> 1993.09.15	<b>(73) Titular(es):</b> ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC. 1001 U.S. ROUTE NR. 303 RARITAN, NEW JERSEY 08869-0606 US
(30) <b>Prioridade:</b> 1992.09.15 US 945280	GEORGETOWN UNIVERSITY 37TH E O STREETS N.W. WASHINGTON, D.C. 20057 US
(43) <b>Data de publicação do pedido:</b> 1995.09.20	<b>(72) Inventor(es):</b>  RICHARD S. SMITH US GARY R. PEARSON US ELLIOT D. PARKS US SUSAN VARGHESE US
(45) <b>Data e BPI da concessão:</b> 2000.08.30	<b>(74) Mandatário(s):</b> JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) **Epígrafe:** PÉPTIDOS IMUNORREACTIVOS DO VÍRUS EPSTEIN-BARR

(57) **Resumo:**



f l A

**DESCRIÇÃO****"PÉPTIDOS IMUNORREACTIVOS DO VÍRUS EPSTEIN-BARR"****ANTECEDENTES DA INVENÇÃO****1. Campo da Invenção**

Esta invenção refere-se ao diagnóstico e à terapia de doença associada ao vírus Epstein-Barr. Mais especificamente, estas modalidades são baseadas na descoberta de péptidos específicos para EBV.

**2. Descrição da Arte Relacionada**

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um herpesvírus humano que é endêmico em todas as populações humanas. A maioria das pessoas é infectada cedo durante a infância e pode então ser portadora do vírus durante toda a vida. Se a infecção inicial for atrasada até à adolescência, frequentemente resulta em mononucleose infecciosa (IM). O vírus também está ligado a certos tipos de cancro. Na cintura da incidência de malária em África, o EBV é um factor de contribuição para o desenvolvimento de linfoma de Burkitt e no Sudeste Asiático o vírus está ligado a uma elevada incidência de carcinomas nasofaríngicos indiferenciados.

A infecção viral aguda leva à produção de antigénios nucleares específicos (denominados EBNA-I e EBNA-II), de um complexo de "antigénio precoce" (EA), de antigénios da cápside viral (VCA), e de outras moléculas associadas. O "complexo de antigénio precoce" consiste nos antigénios "antigénio precoce difuso" (EA-D) e "antigénio precoce restrito" (EA-R), baseados na sua distribuição em ensaios de imunofluorescência no citoplasma mais núcleo (i.e. distribuição difusa) ou apenas no citoplasma (i.e.

restrita) e baseados na sua aparência de coloração em células fixadas com metanol. Estes antigénios EA, com peso molecular de 50-55 Kd, 17 Kd e 85 Kd, respectivamente, são sintetizados durante a fase "lítica" da infecção com EBV e não em células linfoblastóides transformadas. Os anticorpos contra os antigénios precoces estão presentes durante infecção aguda com EBV e depois desaparecem à medida que o vírus entra numa fase de latência. O reaparecimento de anticorpos anti-EA sinalizam a reactivação viral e proporcionam uma pista para um papel possível deste vírus em doenças tais como carcinoma nasofaríngeo e linfoma de Burkitt.

Evidência indirecta sugeriu um possível papel para a reactivação de EBV em doentes com síndrome de Sjogren, uma desordem auto-imune caracterizada por infiltrados linfóides da glândula salivar (o local normal para a latência de EBV). Dado que os anticorpos contra antigénios EA são detectados por ensaios de imunofluorescência, tais anticorpos não podem ser detectados em doentes que possuem anticorpos anti-nucleares e anti-citoplásmicos como parte de uma doença auto-imune. Por isso, seria desejável possuir moléculas EA purificadas para permitir a medição de anticorpos anti-EA em doentes com doenças auto-imunes e para quantificar mais rigorosamente anticorpos anti-EA noutros doentes com EBV agudo ou reactivado.

Recentemente, a sequência de ADN de EBV foi determinada (Baer, et al., *Nature* 310:207, 1984) e o antigénio EA-D foi localizado no genoma. Utilizando um anticorpo monoclonal dirigido contra a proteína EA-D, foi purificada proteína suficiente para permitir uma determinação parcial da sequência de aminoácidos e assim a localização das sequências codificantes. Utilizando esta informação, foi possível preparar uma série de péptidos sintéticos baseados na sequência de ADN. A mesma estratégia provou ser útil na identificação de epitopos imunologicamente

importantes no antigénio EBNA-I (Rhodes, et al., *J. Immunol.*, 134:211, 1985) e nos antigénios EBNA-II (Dillner, *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:4652, 1984) de EBV. Também foi descrito um péptido sintético derivado de uma molécula de EA-D que contém um epitopo reactivo com soros imunes humanos de doentes com IM e outros estados de doença (Fox, et al., *J. Clin. Lab. Anal.*, 1:140, 1987).

Estudos recentes demonstraram que polipéptidos sintetizados quimicamente correspondentes a segmentos lineares curtos de uma sequência de resíduos de aminoácidos primários de uma proteína podem ser utilizados para induzir anticorpos que imunorreagem com a proteína nativa (Lerner, et al., *Nature*, 299:592, 1982; Sutcliffe, et al., *Science*, 219:260, 1983). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram que os polipéptidos sintéticos podem imunorreagir com anticorpos induzidos por proteínas nativas (Rhodes, et al., *J. Immunol.*, 134:211, 1985). Assim, alguns polipéptidos sintéticos podem mimar imunologicamente os determinantes imunogénico e antigénico de proteínas nativas.

Contudo, como é bem conhecido na arte, a aplicação da tecnologia de péptidos sintéticos ainda sofre de várias limitações. Por exemplo, a identificação de péptidos capazes de mimar os determinantes antigénicos de uma proteína nativa requer o conhecimento da sequência de resíduos de aminoácidos da proteína. Enquanto que a sequência de resíduos de aminoácidos pode ser prevista a partir da sequência de ácido nucleico do gene que codifica para a proteína, tal previsão só pode ser realizada se for conhecida a grelha de leitura correcta do gene.

A sequência de ácido nucleico do genoma de EBV é conhecida. Contudo, mesmo que a sequência de resíduos de aminoácidos de uma proteína seja conhecida, os métodos para identificação dos loci na proteína que constituem os determinantes imunogénicos e

f l A

antigénicos são experimentais por natureza e não produzem resultados previsíveis. Existem pelo menos duas razões para isto. Primeiro, sem conhecer a estrutura 3-D de uma proteína não existe um método fiável para determinar que segmentos lineares da proteína estão acessíveis ao sistema imunitário do hospedeiro. Segundo, quer a estrutura 3-D seja conhecida ou não, os polipéptidos lineares curtos parecem não ter frequentemente a capacidade para mimar as estruturas conformacionais secundária e terciária requeridas para constituir determinantes imunogénicos e antigénicos apropriados (Tainer, et al., *Nature*, 312:127, 1984). Contudo, têm sido desenvolvidos métodos, tais como o algoritmo de Berzofsky (programa AMPHI, 1987), que permitem a identificação dos epitopos dominantes de uma molécula que interagem preferencialmente com células T ou B.

Estudos anteriores examinaram a resposta imunitária celular a antigénios induzidos por EBV sintetizados durante o ciclo de replicação do vírus (Pothen, et al., *Int. J. Cancer*, 49:656, 1991). Os resultados demonstraram que alguns dos comportamentos do complexo de antigénio precoce (EA) eram muito eficazes na indução de uma forte resposta proliferativa de células T, semelhante à previamente observada com a glicoproteína de membrana principal, gp350/250 (Ulaeto, et al., *Europ. J. Immunol.*, 18:1689, 1988). Tanto populações de linfócitos CD4+ como CD8+ de dadores infectados com EBV proliferaram na presença de polipéptidos purificados a partir do complexo EA por cromatografia de imunoafinidade. O polipéptido principal de EA-D e um dos polipéptidos principais de EA-R foram particularmente eficazes neste ensaio de reconhecimento de células T. Os resultados sugerem que estes componentes do complexo EA podem funcionar como antigénios alvo importantes na imunovigilância de células infectadas com EBV ou imortalizadas. A identificação dos epitopos dominantes de células T e B expressos pelos polipéptidos do complexo EA-R proporcionaria informação sobre a

importância das respostas de anticorpo destes componentes no diagnóstico e gestão de indivíduos com doenças linfoproliferativas associadas a EBV.

Seria desejável desenvolver métodos melhorados para ensaiar a presença de EA-R ou EA-D e anticorpos anti-EA-R ou anti-EA-D numa amostra corporal, de modo a permitir diagnosticar o envolvimento de EBV na doença, bem como diagnosticar o estágio de uma doença tal como mononucleose infecciosa. A identificação desses epitopos de células B e T em polipéptidos EA-R/EA-D seria um passo importante em direcção à síntese de moléculas para utilização nos objectivos de diagnóstico e gestão da doença em indivíduos com doenças linfoproliferativas associadas a EBV.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção proporciona polipéptidos que definem sítios imunogénicos que são específicos para o vírus Epstein-Barr (EBV). Estes polipéptidos podem ser utilizados para imunodiagnóstico e imunoterapia de doenças associadas a EBV e para produzir anticorpos monoclonais que se liguem especificamente a esses polipéptidos. Estes anticorpos monoclonais podem ser utilizados para detectar o antigénio compreendendo o polipéptido da invenção e também utilizados terapêuticamente para melhorar a doença associada a EBV.

Os detalhes da realização preferida da presente invenção são apresentados nas figuras acompanhantes e na descrição abaixo. Uma vez que os detalhes da invenção sejam conhecidos, numerosas inovações e alterações adicionais tornar-se-ão óbvias para um especialista na técnica.

### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIGURA 1 apresenta um mapa esquemático do genoma de EBV denotando a grelha de leitura HRF1 de *Bam* HI e as regiões em BHRF1 codificando para os péptidos sintéticos.

A FIGURA 2 apresenta a resposta de proliferação de PBL de três indivíduos anti-VCA-positivos, anti-EA-negativos (A-C) a diferentes concentrações dos três péptidos sintéticos p17.

A FIGURA 3 apresenta a resposta de proliferação das subpopulações de células T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, de dois dadores (A e B) a diferentes concentrações do péptido sintético P17.1.

A FIGURA 4 apresenta a reactividade serológica de diferentes soros com os péptidos sintéticos p17 (17.1, 17.2, 17.3). Todos os soros foram testados em ELISA a diluição de 1:10. Os números entre parêntesis em cada coluna representam o número de soros não reactivos (absorvância < 0,1).

A FIGURA 5 apresenta a reactividade serológica de soros anti-EA positivos de diferentes categorias de doenças contra os péptidos sintéticos p17. Todos os soros foram testados a uma diluição de 1:10. ABL, Linfoma de Burkitt Africano; NANHL, linfomas não de Hodgkin Norte Americanos incluindo linfomas de células grandes de grau intermédio, ou linfoma de células B de grau elevado. NANPC, Carcinoma Nasofaríngeo Norte Americano. Os números entre parêntesis em cada coluna representam o número de soros não reactivos (absorvância < 0,1).

f l A

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Uma realização preferida da invenção compreende os polipéptidos epitópicos ETFTETWNRFITHTTE (SEQ. I.D.NO. 1), GMLEASEGLDGWIHQ (SEQ. I.D. NO. 2), HQQGGWSTLIEDNIP (SEQ. I.D. NO. 3), KQKHPKKVKQAFNPL (SEQ. ID. NO. 4) e variações conservadoras e misturas destes péptidos. O termo "variação conservadora" como aqui utilizado, denota a substituição de um resíduo de aminoácido por outro resíduo biologicamente semelhante. Exemplos de variações conservadoras incluem a substituição de um resíduo hidrofóbico tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, ou a substituição de um resíduo polar por outro, tal como a substituição de arginina por lisina, ácidos glutâmico por aspártico, ou glutamina por asparagina e afins. O termo "variação conservadora" também inclui a utilização de um aminoácido substituído na posição de um aminoácido não substituído inicial, desde que os anticorpos produzidos contra o polipéptido substituído também imunorream com o polipéptido não substituído. Assim, através da utilização de um método de pesquisa de rotina, tal como testando uma variante conservadora do polipéptido com soros de um doente com doença associada a EBV, um especialista na técnica poderá determinar rapidamente se a variante do polipéptido possui a actividade biológica requerida do polipéptido da invenção sem recurso a experimentação desnecessária.

Os polipéptidos epitópicos da invenção podem conter aminoácidos adicionais nos terminais amino e carboxilo, de modo a aumentar a sua reactividade serológica. Preferencialmente, os aminoácidos adicionais são os aminoácidos que ocorrem naturalmente na proteína, em variações conservadoras destes aminoácidos, e variam em número desde cerca de 0 até 5 independentemente. Por exemplo, uma variação de SEQ. I.D. NO. 1 compreende o polipéptido epitópico, QNSETFTETWNRFITHTTEHVD, em que os

aminoácidos sublinhados representam extensões dos polipéptidos originais. Os polipéptidos da invenção também podem ser utilizados como unidades de repetição variando de 1 até cerca de 1000 unidades de comprimento. Estas unidades podem ser homogêneas, por exemplo, em que todas as unidades são repetições do mesmo polipéptido ou podem ser misturas dos polipéptidos da invenção.

Os péptidos da invenção podem ser utilizados individualmente, em misturas, ou como multímeros tais como agregados, polímeros e afins. Assim, a invenção abarca polipéptidos que compreendem um ou mais do mesmo, ou diferentes, polipéptidos da invenção para produzir um polímero homogêneo ou heterogêneo, em relação aos polipéptidos particulares da invenção que estão aqui contidos. Técnicas apropriadas para produzir várias misturas, agregados, multímeros e afins serão bem conhecidas dos especialistas na técnica. Por exemplo, a invenção inclui um polipéptido compreendendo SEQ. I.D. NO.1 e SEQ. I.D. NO. 2 ou NO.3, ou qualquer combinação destes, em que as sequências são ligadas directa ou indirectamente, por exemplo, utilizando um meio espaçador ou ligante.

Os péptidos da invenção podem ser sintetizados por métodos bem conhecidos, tal como o método de síntese de péptidos em fase sólida descrito por Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1962, e Stewart e Young, *Solid Phase Peptides Synthesis*, (Freeman, San Francisco, 1969, pp. 27-62), utilizando um copoli(estireno-dinilbenzeno) contendo 0,1-1,0 mMol de aminas/g de polímero. Após a síntese química estar completa, os péptidos podem ser desprotegidos e clivados do polímero por tratamento com anisole líquido HF-10% durante cerca de ¼-1 hora a 0°C. Após evaporação dos reagentes, os péptidos são extraídos do polímero com solução de ácido acético a 1% que é então liofilizado para produzir o material bruto. Este pode ser normalmente purificado por

f l A

técnicas tais como filtração em gel em SEPHADEX G-15 utilizando ácido acético a 5% como solvente. A liofilização de fracções apropriadas da coluna produzirá o péptido ou derivados do péptido homogéneos, que podem então ser caracterizados por técnicas padrão tais como análise de aminoácidos, cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de elevado desempenho, espectroscopia de absorção de ultravioletas, rotação molar, solubilidade, e quantificados por degradação de Edman em fase sólida.

Durante ou após a síntese os aminoácidos reactivos podem ser protegidos por vários grupos bloqueadores, por exemplo, as cisteínas podem ser bloqueadas por grupos 3,4-dimetilbenzilo (DMB), as argininas e histidinas por grupos tosilo (TOS), o ácido aspártico e o ácido glutâmico por grupos benzilo(Bzl), e as lisinas por grupos 2-clorobenzilocarboxílicos (2-CBZ). São bem conhecidos outros grupos bloqueadores protectores e podem ser utilizados na presente invenção. Os especialistas com experiência média na técnica conhecerão outras técnicas para síntese de péptidos, ou podem verificar tais técnicas sem recurso a experimentação inconveniente.

Alternativamente, os polipéptidos da invenção podem ser produzidos utilizando técnicas recombinantes normalmente conhecidas por especialistas na técnica (ver, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, et al., Eds. Wiley Interscience Press, 1989).

A invenção também proporciona polinucleótidos que codificam para os polipéptidos da invenção. Como aqui utilizado, "polinucleótido" refere-se a um polímero de desoxirribonucleótidos ou ribonucleótidos, na forma de um fragmento separado ou como um componente de uma construção maior. O ADN que codifica para um péptido da invenção pode ser

f L A

montado a partir de fragmentos de ADNc ou a partir de oligonucleótidos que proporcionam um gene sintético que é capaz de ser expresso numa unidade de transcrição recombinante. As sequências de polinucleótidos da invenção incluem ADN, ARN e sequências de ADNc. Uma sequência de polinucleótido pode ser deduzida a partir do código genético, contudo, a degeneração do código deve ser tida em conta. Os polinucleótidos da invenção incluem sequências que são degeneradas como resultado do código genético. A invenção também inclui sequências que são complementares e podem hibridar com os polinucleótidos que codificam os polipéptidos da invenção.

O termo "doença associada a EBV" significa qualquer doença causada, directa ou indirectamente, por EBV, bem como doenças que predispõem um doente a infecção por EBV. Exemplos de doenças que se integram na primeira categoria incluem a mononucleose infecciosa, carcinoma nasofaríngeo e linfoma de Burkitt. Doenças da última categoria (i.e., aquelas que colocam o doente em risco de infecção por EBV) incluem o síndrome de Sjorgren e, geralmente, qualquer condição que cause um estado de imunossupressão ou decréscimo da função do sistema imunitário tais como doentes que recebem transplantes de órgãos e certas terapias de cancro.

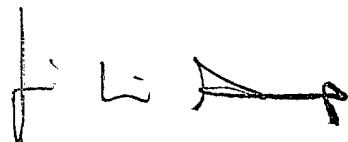
A presente invenção refere-se ainda a anticorpos monoclonais que são específicos para os polipéptidos da invenção bem como à utilização de diagnóstico e terapêutica desses anticorpos monoclonais. Isto permite especificamente que o anticorpo monoclonal, e anticorpos monoclonais afins com actividade afim, possam ser utilizados para ligar o polipéptido da invenção quando o polipéptido, ou aminoácidos compreendendo o polipéptido, estejam presentes em espécimens ou num hospedeiro, tal como um humano.

Podem ser utilizadas numerosas técnicas para produzir os anticorpos monoclonais da invenção sem recurso a experimentação inconveniente. Em grande medida, os produtos de tais anticorpos monoclonais são tornados rotina, devido à natureza altamente definida dos polipéptidos da invenção. Assim, quer os polipéptidos da invenção sejam utilizados para imunização ou para pesquisa, o número muito limitado de determinantes imunogénicos nos polipéptidos simplifica grandemente a identificação de linhas celulares que produzem anticorpos monoclonais da invenção, por exemplo, limitando o repertório de expressão clonal possível.

Um tipo de linha celular muito útil para a expressão de anticorpos monoclonais da invenção é o hibridoma. O método geral utilizado para a produção de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais é bem conhecida (Kohler e Milstein, *Nature*, 256:495, 1975). Os hibridomas resultantes foram então pesquisados para a produção de anticorpos monoclonais capazes de se ligar aos polipéptidos da invenção.

As técnicas de sensibilização e/ou imunização, fusão celular, produção de ascites, selecção de hibridomas mistos, ou subclonagem de hibridomas monoclonais são geralmente bem conhecidas na técnica. Dirige-se a atenção para Koprowski, et al., Patente U.S. No. 4 172 124, Koprowski, et al., Patente U.S. No. 4 196 265, ou Douillard, J.Y. e Hoffman, T. *Basic Facts about Hybridomas*, em *Compendium of Immunology*, Vol II, L.Schwartz, ed. (1981).

Geralmente, os péptidos epitópicos purificados possuem uma cisteína ligada ao terminal C para permitir a ligação unidireccional do péptido sintético a uma proteína imunogénica através de uma ponte de ligação, por exemplo, hemocianina de lapa maleimidobezoílada (MB), (KLH). Outros conjugados



imunogénicos podem também ser utilizados, por exemplo, albumina e afins. A estrutura resultante pode possuir várias estruturas peptídicas ligadas a uma molécula de proteína.

As células somáticas derivadas de um hospedeiro imunizado contra os péptidos sintéticos podem ser obtidas por qualquer técnica de imunização adequada. O hospedeiro alvo é imunizado por administração do antigénio, usualmente sob a forma de um conjugado de proteína, como acima indicado, por qualquer método adequado, preferencialmente por injeção, quer intraperitonealmente, intravenosamente, subcutaneamente, ou na almofada no pé. Os adjuvantes podem ser incluídos no protocolo de imunização.

A imunização inicial com o antigénio ligado à proteína pode ser seguida por várias injeções de reforço dadas periodicamente a intervalos de várias semanas. O anticorpo contido no plasma de cada hospedeiro pode então ser testado quanto à sua reactividade com o polipéptido imunizante da invenção. O hospedeiro possuindo maior resposta é normalmente o mais desejável como dador das células somáticas que segregam anticorpos na produção de hibridomas. Alternativamente, a hiperimunização pode ser efectuada por injeção repetida de quantidades adicionais de conjugado péptido-proteína por via intravenosa e/ou intraperitoneal.

O isolamento de hibridomas produzindo anticorpos monoclonais da invenção pode ser efectuada utilizando técnicas de pesquisa de rotina que permitem a determinação do padrão de reacção elementar do anticorpo monoclonal de interesse. Assim, se um anticorpo monoclonal testado se liga ao polipéptido da invenção então o anticorpo a ser testado e o anticorpo produzido pelos hibridomas da invenção são equivalentes.

Alternativamente, uma vez que a invenção revela polipéptidos ou sequências de aminoácidos que são especificamente necessárias para ligação dos anticorpos monoclonais preferidos da invenção, é agora possível utilizar estes péptidos para efeitos de imunização para produzir hibridomas que, por sua vez, produzem anticorpos monoclonais específicos para o polipéptido. Esta abordagem tem a vantagem adicional de diminuir o repertório de anticorpos monoclonais gerados por limitação do número de determinantes antigénicos apresentados na imunização pelo polipéptido. Os anticorpos monoclonais produzidos por este método podem ser pesquisados quanto à especificidade utilizando técnicas padrão, por exemplo, por ligação do polipéptido a uma placa de microtitulação e medindo a ligação do anticorpo monoclonal por um ensaio ELISA.

É também possível determinar, sem efectuar experimentação, se um anticorpo monoclonal possui a mesma especificidade que um anticorpo monoclonal da invenção certificando se o primeiro evita a ligação do segundo ao polipéptido da invenção. Se o anticorpo monoclonal a ser testado compete com o anticorpo monoclonal da invenção, como mostrado por uma diminuição na ligação pelo anticorpo monoclonal da invenção, então é provável que os dois anticorpos monoclonais se liguem ao mesmo epitopo ou a um bastante relacionado.

Ainda outra maneira para determinar se um anticorpo monoclonal possui a especificidade de um anticorpo monoclonal da invenção consiste na pré-incubação do anticorpo monoclonal da invenção com o polipéptido da invenção com o qual é normalmente reactivo, e depois adicionar o anticorpo monoclonal a ser testado para determinar se o anticorpo monoclonal testado é inibido na sua capacidade de ligação ao antigénio. Se o anticorpo monoclonal a ser testado é inibido, então, com toda a probabilidade, possui a

mesma especificidade epitópica, ou uma estritamente relacionada, que o anticorpo monoclonal da invenção.

Enquanto a utilização *in vivo* de um anticorpo monoclonal de uma espécie dadora estranha numa espécie receptora hospedeira diferente não é geralmente complicada, pode aparecer um potencial problema que consiste no aparecimento de uma resposta imunológica adversa do hospedeiro aos determinantes antigénicos presentes no anticorpo dador. Nalguns casos, esta resposta adversa pode ser tão severa que impede a utilização *in vivo* do anticorpo dador no hospedeiro. Além disso, a resposta adversa do hospedeiro pode servir para dificultar a eficácia do anticorpo dador na supressão da doença associada a EBV. Uma forma em que é possível ultrapassar a probabilidade de uma resposta imunitária adversa ocorrer no hospedeiro, é utilizando anticorpos quiméricos (Sun *et al.*, *Hybridoma*, 5 (Supplement 1): S17, 1986; Oi, *et al.*, *BioTechniques*, 4(3): 214, 1986). Anticorpos quiméricos são anticorpos em que os vários domínios das cadeias leve e pesada dos anticorpos são codificadas por DNA de mais de uma espécie. Tipicamente, um anticorpo quimérico compreende os domínios variáveis das cadeias pesadas ( $V_H$ ) e leves ( $V_L$ ) derivadas da espécie dadora produzindo o anticorpo com a especificidade antigénica preferida, e os domínios variáveis das cadeias pesadas ( $C_H$ ) e leves ( $C_L$ ) derivadas da espécie hospedeira receptora. Crê-se que reduzindo a exposição do sistema imunitário do hospedeiro aos determinantes antigénicos dos domínios de anticorpo dador, especialmente nas regiões  $C_H$ , a possibilidade de uma reacção imunológica adversa ocorrer seja reduzida. Assim, por exemplo, é possível produzir um anticorpo quimérico para utilização clínica *in vivo* em humanos que compreende os domínios de ratinho  $V_H$  e  $V_L$  codificados por ADN isolado de um hibridoma da invenção e os domínios  $C_H$  e  $C_L$  codificados por ADN isolado de um leucócito humano.

Em certas circunstâncias, anticorpos monoclonais de um dado isotipo podem ser mais preferíveis do que outros em termos da sua eficácia terapêutica ou de diagnóstico. Por exemplo, a partir de estudos em citólise mediada por anticorpos, é conhecido que anticorpos monoclonais de murganho do isotipo gama-2a e gama-3 são geralmente mais eficazes na lise de células alvo do que os anticorpos do isotipo gama-1. Pensa-se que esta eficácia diferencial seja devida à capacidade dos isotipos gama-2a e gama-3 participarem mais activamente na destruição citolítica das células alvo. Podem ser preparados isotipos particulares de um anticorpo monoclonal directamente, por selecção da fusão inicial, ou preparados secundariamente, a partir de um hibridoma parental segregando um anticorpo monoclonal de isotipo diferente por utilização da técnica de selecção sib para isolar variantes "class-switch" (Steplewski, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8653, 1985; Spira, *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 74: 307, 1984). Assim, os anticorpos monoclonais da invenção incluirão as variantes "class-switch" possuindo especificidade para um polipéptido da invenção.

O isolamento de outros hibridomas segregando anticorpos monoclonais com a especificidade dos anticorpos monoclonais da invenção pode também ser conseguido por qualquer técnico da especialidade por produção de anticorpos anti-idiotípicos (Herlin, *et al.*, *Science*, 232: 100, 1986). Um anticorpo anti-idiotípico é um anticorpo que reconhece determinantes únicos presentes no anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma de interesse. Estes determinantes estão localizados na região hipervariável do anticorpo. É esta a região que se liga a um determinado epitopo e assim, é responsável pela especificidade do anticorpo. Um anticorpo anti-idiotípico pode ser preparado imunizando um animal com o anticorpo monoclonal de interesse. O animal imunizado reconhecerá e responderá aos determinantes idiotípicos do anticorpo imunizante e produzirá um anticorpo com

f l A

estes determinantes idiotípicos. Utilizando os anticorpos anti-idiotípicos do animal imunizado, que são específicos para o anticorpo monoclonal produzido por um único hibridoma que foi utilizado para imunizar o segundo animal, é agora possível identificar outros clones com o mesmo idiótipo do anticorpo do hibridoma utilizado para a imunização.

A identidade idiotípica entre anticorpos monoclonais e dois hibridomas demonstra que os dois anticorpos monoclonais são o mesmo no que respeita ao seu reconhecimento do mesmo epitopo determinante. Assim, utilizando anticorpos anti-idiotípicos, é possível identificar outros hibridomas que expressem anticorpos monoclonais possuindo a mesma especificidade epitópica.

É também possível utilizar a tecnologia anti-idiotípica para produzir anticorpos monoclonais que mimam um epitopo. Por exemplo, um anticorpo monoclonal anti-idiotípico feito para um primeiro anticorpo monoclonal possuirá um domínio de ligação na região hipervariável que é a "imagem" do epitopo ligado pelo primeiro anticorpo monoclonal. Assim, o anticorpo monoclonal anti-idiotípico pode ser utilizado para imunização uma vez que o domínio de ligação do anticorpo monoclonal anti-idiotípico actua efectivamente como um antigénio.

Os anticorpos monoclonais humanos são especialmente preferidos para diagnóstico *in vivo* e terapia da doença associada a EBV. Avanços recentes nas técnicas de anticorpos monoclonais tornou agora possível a capacidade para produzir rapidamente anticorpos monoclonais humanos utilizando técnicas de clonagem recombinante. Tipicamente, estas técnicas utilizam linfócitos de um paciente que demonstrou anticorpos contra o antigénio de interesse seguido pela produção de uma biblioteca recombinatória de ácidos nucleicos isolados desses linfócitos. Esta biblioteca contém um vector de expressão adaptado para permitir a clonagem

de cadeias pesadas e leves no organismo hospedeiro. Colónias individuais produzindo um anticorpo com a especificidade desejada para um determinado antigénio são identificados, por exemplo, fixando os antigénios a um suporte sólido e fazendo a "selecção por afinidade" para o anticorpo. (ver, por exemplo, Burton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10134, 1991).

Assim, um técnico da especialidade pode analogamente produzir anticorpos monoclonais humanos específicos para os péptidos da invenção como modo de rotina por produção de uma biblioteca recombinatória utilizando ácido nucleico, preferencialmente ARNm, dos linfócitos de um indivíduo com imunidade humoral contra EBV e pesquisa da biblioteca assim produzida utilizando os polipéptidos da invenção. À luz da natureza altamente definida dos polipéptidos da invenção, cada polipéptido possuirá poucos epitopos (provavelmente 1 ou 2) e a pesquisa da biblioteca pode ser efectuada de uma forma simples e altamente específica sem requerer formação especializada.

O termo "anticorpo" como utilizado nesta invenção, pretende incluir moléculas intactas, assim como fragmentos destas tais como Fab e F(ab')<sub>2</sub>, que são capazes de ligação ao determinante epitópico.

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser utilizados em qualquer animal em que seja desejável administrar *in vitro* ou *in vivo* imunodiagnóstico ou imunoterapia. O termo "animal" como aqui utilizado pretende incluir tanto humanos como não humanos.

Os anticorpos monoclonais da invenção são adequados para utilização em, por exemplo, imunoensaios em que podem ser utilizados em fase líquida ou ligados a um transportador de fase sólida. Adicionalmente, os anticorpos monoclonais nestes imunoensaios podem ser detectavelmente marcados de várias

f l A

formas. Exemplos de tipos de imunoensaios que podem utilizar anticorpos monoclonais da invenção são imunoensaios competitivos e não competitivos num formato directo ou indirecto. Exemplos de tais imunoensaios são o radioimunoensaio (RIA) e o ensaio em sanduíche (imunométrico). A detecção de antigénios utilizando anticorpos monoclonais da invenção pode ser efectuada utilizando imunoensaios que decorrem em modo avançado, reverso ou em simultâneo, incluindo ensaios em amostras fisiológicas. Os técnicos da especialidade saberão, ou podem rapidamente discernir, outros formatos de imunoensaio sem necessidade de experimentação desnecessária.

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser ligados a muitos transportadores diferentes e utilizados para detectar a presença de um antigénio compreendendo um polipéptido da invenção. Exemplos de transportadores bem conhecidos incluem vidro, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilases, celulosas naturais e modificadas, poliacrilamidas, agaroses e magnetite. A natureza do transportador pode ser solúvel ou insolúvel para os objectivos da invenção. Os especialistas na técnica terão conhecimento de outros transportadores adequados para a ligação de anticorpos monoclonais, ou terão capacidade para os determinar, utilizando experiências de rotina.

Existem muitos marcadores diferentes e métodos de marcação conhecidos pelos técnicos da especialidade. Exemplos de tipos de marcadores que podem ser utilizados na presente invenção incluem enzimas, radioisótopos, compostos fluorescentes, metais coloidais, compostos quimioluminescentes, compostos fosforescentes e compostos bioluminescentes. Os especialistas da técnica conhecerão outros marcadores adequados para ligação ao anticorpo monoclonal, ou serão capazes de os estabelecer, utilizando experiências de rotina. Além disso, a ligação destes

marcadores ao anticorpo monoclonal da invenção pode ser efectuada utilizando técnicas padrão familiares de especialistas da técnica.

Para os objectivos da invenção, um anticorpo específico para um polipéptido da invenção ou um antigénio compreendendo um polipéptido da invenção pode ser detectado pelos anticorpos monoclonais da invenção quando presentes em fluidos biológicos e tecidos. Qualquer espécimen contendo uma quantidade detectável de tal antigénio pode ser utilizado. Uma amostra pode ser um líquido tal como urina, saliva, fluido cerebrospinal, sangue, soro e afins, ou um sólido ou semi-sólido tais como tecidos, fezes e afins, ou alternativamente, um tecido sólido como os normalmente utilizados em diagnóstico histológico. Uma amostra especialmente preferida é o sangue.

Outra técnica que pode também resultar em maior sensibilidade consiste no acoplamento dos anticorpos a haptenos de baixo peso molecular. Estes haptenos podem ser especificamente detectados através de uma segunda reacção. Por exemplo, é comum utilizar haptenos tais como biotina, que reage com avidina, ou dinitrofenil, piridoxal e fluoresceína, que podem reagir com anticorpos anti-hapteno específicos.

Como utilizado nesta invenção, o termo "epitopo" pretende incluir qualquer determinante capaz de interacção específica com os anticorpos monoclonais da invenção. Os determinantes epitópicos consistem normalmente em grupos de moléculas de superfície quimicamente activas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcares e possuem normalmente características estruturais tridimensionais, assim como características de carga específicas.

f l A

Ao utilizar os anticorpos monoclonais da invenção para a detecção *in vivo* de antigénio, o anticorpo monoclonal marcado detectável é administrado numa dose que é diagnosticamente eficaz. O termo "diagnosticamente eficaz" significa que a quantidade de anticorpo marcado detectável é administrado em quantidade suficiente para possibilitar a detecção do sítio possuindo o antigénio compreendendo um polipéptido da invenção para o qual os anticorpos monoclonais eram específicos.

A concentração de anticorpo monoclonal marcado detectável que é administrada deve ser suficiente para a ligação às células possuindo o polipéptido é detectável em comparação com o ruído de fundo. Adicionalmente, é desejável que o anticorpo monoclonal marcado detectável seja rapidamente eliminado do sistema circulatório de modo a produzir a melhor razão sinal alvo-ruído de fundo.

Como regra, a dosagem de anticorpo monoclonal marcado detectável para diagnóstico *in vivo* variará dependendo em factores tais como a idade, sexo, e extensão da doença no indivíduo. A dosagem de anticorpo monoclonal pode variar desde cerca de 0,01 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 500 mg/m<sup>2</sup>, preferencialmente 0,1 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 200 mg/m<sup>2</sup>, mais preferencialmente cerca de 0,1 mg/m<sup>2</sup> a cerca de 10 mg/m<sup>2</sup>. Tais dosagens podem variar, por exemplo, dependendo de quantas injecções múltiplas são dadas, fardo antigénico, e outros factores conhecidos dos técnicos da especialidade.

Para imagem de diagnóstico *in vivo*, o tipo de instrumento de detecção disponível é um factor importante na selecção de um dado radioisótopo. O radioisótopo escolhido deve ter um tipo de decaimento que seja detectável para um dado tipo de instrumento. Ainda outro factor importante na selecção de um radioisótopo para o diagnóstico *in vivo* é que a semi-vida do radioisótopo seja suficientemente longa para que seja ainda detectável no

f l A

instante de incorporação máxima pelo alvo, mas que seja suficientemente curta para que seja minimizada a radiação prejudicial com respeito ao hospedeiro. Idealmente, um radioisótopo utilizado para imagem *in vivo* não possuirá emissão de partículas, mas produzirá um grande número de fótons no intervalo de 140-250 keV, que podem ser rapidamente detectados por câmaras gama convencionais.

Para o diagnóstico *in vivo* os radioisótopos podem ser ligados a imunoglobulinas seja directa ou indirectamente utilizando um grupo funcional intermediário. Os grupos funcionais intermediários que são frequentemente utilizados para ligar radioisótopos que existem como iões metálicos a imunoglobulinas são os agentes quelantes bifuncionais tais como ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA) e ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA) e moléculas semelhantes. Exemplos típicos de iões metálicos que podem ser ligados aos anticorpos monoclonais da invenção são  $^{111}\text{In}$ ,  $^{97}\text{Ru}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  e  $^{201}\text{Tl}$ .

Os anticorpos monoclonais da invenção podem também ser marcados com um isótopo paramagnético para objectivos de diagnóstico *in vivo*, como em imagem de ressonância magnética (MRI) ou ressonância electrónica de spin (ESR). Em geral, qualquer método convencional para visualizar imagem para diagnóstico pode ser utilizado. Normalmente, os radioisótopos que emitem gama ou positrões são utilizados para imagem vídeo e isótopos paramagnéticos para MRI. Elementos que são particularmente úteis em tais técnicas incluem  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{162}\text{Dy}$ ,  $^{52}\text{Cr}$  e  $^{56}\text{Fe}$ .

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser utilizados *in vitro* e *in vivo* para monitorizar o decurso da melhora da doença associada ao EBV num animal. Assim, por exemplo, medindo o aumento ou decréscimo no número de células expressando o

antigénio compreendendo um polipéptido da invenção ou alterações na concentração de tal antigénio presente em vários fluidos do corpo, será possível determinar se um regime terapêutico particular que se propõe melhorar a doença associada ao EBV é eficaz.

O termo "melhorar" denota uma diminuição no efeito de detrimento da doença associada a EBV no animal que recebe a terapia. O termo "terapeuticamente eficaz" significa que a quantidade de anticorpo monoclonal ou polipéptido utilizado é em quantidade suficiente para melhorar a doença associada a EBV.

O termo "quantidade imunologicamente eficaz" como utilizado na invenção, é a quantidade de polipéptido que é necessária para induzir uma melhora na resposta imunitária à doença associada a EBV, por exemplo, estimulando a produção de anticorpos que se ligarão a um antigénio compreendendo um polipéptido da invenção.

Induzindo uma resposta imunitária a um polipéptido da invenção, o polipéptido pode ser administrado parentericamente por injeção, infusão rápida, absorção nasofaríngea, absorção dérmica e oralmente. As preparações para administração parental incluem soluções aquosas ou não aquosas estéreis, suspensões e emulsões. Exemplos de solventes não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Podem ser utilizados transportadores para pensos oclusivos para aumentar a permeabilidade da pele e melhorar a absorção de antigénio. As formas de dosagem líquida para administração oral podem geralmente compreender uma solução de lipossoma contendo a forma de dosagem líquida. Formas adequadas para a suspensão de lipossomas incluem emulsões, suspensões, soluções, xaropes e elixires contendo diluentes inertes normalmente utilizados na técnica tais como água purificada.

Para além de diluentes inertes, tais composições podem ainda incluir adjuvantes, agentes de humedecimento, agentes de emulsão e suspensão, e agentes adoçantes, aromatizantes e perfumantes.

É também possível para as preparações antigénicas contendo polipéptidos da invenção incluir um adjuvante. Os adjuvantes são substâncias que podem ser utilizadas para aumentar não especificamente a resposta imunitária. Normalmente, o adjuvante e o antigénio são misturados antes da sua apresentação ao sistema imunitário, ou apresentados separadamente, mas no mesmo sítio do animal a ser imunizado. Os adjuvantes podem ser divididos de uma forma livre em vários grupos com base na sua composição. Estes grupos incluem adjuvantes oleosos (por exemplo, o Completo e Incompleto de Freund), sais minerais (por exemplo,  $AlK(SO_4)_2$ ,  $AlNa(SO_4)_2$ ,  $AlNH_4(SO_4)$ , sílica, alume,  $Al(OH)_3$ ,  $Ca_3(PO_4)_2$ , caolina e carbono), polinucleótidos (por exemplo, ácidos poli IC e poli AU), e certas substâncias naturais (por exemplo, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, assim como substâncias encontradas em *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, e membros do género *Brucella*).

A forma física do antigénio polipéptido que é utilizado para imunizar um animal pode ser ou agregada ou não agregada. O polipéptido agregado pode ser produzido a partir do polipéptido não agregado por técnicas comuns tais como, por exemplo, tratamento com glutaraldeído ou outros agentes de ligação cruzada. O polipéptido agregado assim derivado pode então ser utilizado com objectivos de produzir uma composição eficaz na melhora da doença associada a EBV induzindo uma reacção imunitária activa. No entanto, apesar do animal ser imunizado com agregado ou não agregado, ambas as formas de polipéptido devem causar a produção de anticorpos contra o polipéptido. Assim, é possível utilizar estes anticorpos anti-polipéptido para

diagnóstico, como por exemplo, num "kit" para detectar a presença do polipéptido num espécime.

Como acima descrito, as preparações de polipéptido antigénio da invenção podem ser utilizadas para induzir a produção de anticorpos que se vão ligar a determinantes epitópicos do polipéptido. Um método particularmente útil no melhoramento da produção de anticorpos contra polipéptido é primeiro imunizar com a preparação de polipéptido antigénio da invenção seguido por uma imunização posterior. Existem muitas técnicas diferentes para o intervalo das imunizações quando é utilizado um regime de imunização múltipla. É possível utilizar a preparação antigénica da invenção mais do que uma vez para melhorar os níveis e diversidade da expressão do repertório de imunoglobulinas expressas pelo animal imunizado. Tipicamente, se forem dadas imunizações múltiplas, estas serão espaçadas de um a dois meses. Geralmente, a dosagem do polipéptido administrado a um animal dependerá de factores tais como a idade, condição, sexo, e extensão da doença, se alguma, e outras variáveis que podem ser ajustadas por um técnico da especialidade. As preparações antigénicas de polipéptido da invenção podem ser administradas como dosagens simples ou múltiplas e podem variar desde cerca de 50 mg a cerca de 500 mg de polipéptido antigénio por dose, mais preferencialmente de cerca de 50 mg a cerca de 300 mg por dose, mais preferencialmente cerca de 100 mg a cerca de 200 mg por dose. Os anticorpos monoclonais da invenção podem também ser utilizados sós ou em combinação com células efectoras (Douillard, et al., *Hybridoma*, 5 (Supp. 1: S139, 1986). Para imunoterapia em animais possuindo a doença associada a EBV com epitopos reactivos com os anticorpos monoclonais da invenção.

Quando utilizados para imunoterapia, os anticorpos monoclonais da invenção podem ser não marcados ou marcados com um agente terapêutico. Estes agentes podem ser acoplados directa ou

f l a

indirectamente aos anticorpos monoclonais da invenção. Um exemplo de acoplamento indirecto é pela utilização de uma parte espaçadora. Estas partes espaçadoras, por sua vez, podem ser insolúveis ou solúveis (Diener, et al., *Science*, 231: 148, 1986) e podem ser seleccionados para permitir a libertação de fármacos da molécula de anticorpo monoclonal no sítio alvo. Exemplos de agentes terapêuticos que podem ser acoplados aos anticorpos monoclonais da invenção para imunoterapia são fármacos, radioisótopos, lectinas e toxinas.

Os fármacos que podem ser conjugados aos anticorpos monoclonais da invenção incluem fármacos não proteínados assim como proteínados. Os termos "fármacos não proteínados" incluem compostos que são classicamente referidos como fármacos, por exemplo, mitomicina C, daunorrubicina e vinblastina.

Os fármacos proteínados com que os anticorpos monoclonais da invenção podem ser marcados incluem imunomoduladores e outros modificadores de resposta biológica. O termo "modificadores de resposta biológica" pretende incluir substâncias que estão envolvidas na modificação da resposta imunitária, por exemplo, de modo a melhorar a destruição de uma célula da doença associada a EBV possuindo um antigénio de EBV compreendendo um polipéptido da invenção para o qual os anticorpos monoclonais da invenção são específicos. Exemplos de modificadores da resposta imunitária incluem compostos tais como as linfoquinas. As linfoquinas incluem um factor de necrose de tumores, interleuquinas 1, 2 e 3, linfotoxina, factor de activação de macrófagos, factor de inibição de migração, factor de estimulação de colónias e interferão. Os interferões com que os anticorpos monoclonais da invenção podem ser marcados incluem o alfa-interferão, beta-interferão e gama-interferão e seus subtipos.

f l A

Utilizando os anticorpos monoclonais da invenção radioisotopicamente marcados para imunoterapia, certos isotipos podem se mais preferíveis do que outros dependendo de factores tais como a distribuição de leucócitos, assim como estabilidade e emissão do isotipo. Se desejado, a distribuição de células de tumor pode ser avaliada pelas técnicas de diagnóstico *in vivo* acima descritas. Dependendo da malignidade alguns emissores podem ser preferíveis em relação a outros. Em geral, os radioisótopos que emitem partículas alfa e beta são preferidos para imunoterapia. Por exemplo, se um animal possui um foco de tumor sólido pode ser preferível um emissor beta de alta energia capaz de penetrar alguns milímetros no tecido, tal como  $^{90}\text{Y}$ . por outro lado, se a malignidade consiste em células alvo simples, como no caso de leucemia, pode ser preferível um emissor alfa de alta energia, de intervalo curto, tal como  $^{212}\text{Bi}$ . Exemplos de radioisótopos que podem ser ligados aos anticorpos monoclonais da invenção para propósitos terapêuticos são  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{109}\text{Pd}$  e  $^{188}\text{Re}$ .

As lectinas são proteínas, usualmente isoladas a partir de material de plantas, que se ligam especificamente a açúcares. No entanto, a ricina é uma lectina tóxica que tem sido utilizada imunoterapeuticamente. Isto é preferencialmente conseguido por ligação da cadeia peptídica alfa da ricina, que é responsável pela toxicidade, à molécula de anticorpo para permitir a distribuição local específica do efeito tóxico.

As toxinas são substâncias venenosas produzidas por plantas, animais, ou microrganismos que, em dose suficiente, são frequentemente letais. A toxina da difteria é uma substância produzida por *Corynebacterium diphtheria* que pode ser utilizada terapêuticamente. Esta toxina consiste numa subunidade alfa e uma beta, que em condições apropriadas podem ser separadas. O componente tóxico A pode ser ligado a um anticorpo e utilizado

f l A

para distribuição específica para o local a uma célula transportando um antigénio EBV, para a qual os anticorpos monoclonais da invenção são específicos. São conhecidos outros agentes terapêuticos que podem ser ligados aos anticorpos monoclonais da invenção, ou podem ser facilmente determinados, por pessoas com formação ordinária na arte.

Os anticorpos monoclonais marcados ou não marcados da invenção também podem ser utilizados em combinação com agentes terapêuticos tais como os acima descritos. São especialmente preferidas combinações terapêuticas compreendendo o anticorpo monoclonal da invenção e imunomoduladores e outros modificadores de resposta biológica. Assim, por exemplo, os anticorpos monoclonais da invenção podem ser utilizados em combinação com interferão alfa. Esta modalidade de tratamento aumenta o direccionamento do anticorpo monoclonal para células contendo EBV aumentando a expressão do antigénio reactivo ao anticorpo monoclonal (Greiner, et al., *Science*, 235:895, 1987). Alternativamente, o anticorpo monoclonal da invenção pode ser utilizado, por exemplo, em combinação com interferão gama para assim activar e aumentar a expressão de receptores Fc por células efectoras que, por sua vez, resulta numa ligação aumentada do anticorpo monoclonal à célula efectora e na morte das células tumorais alvo. Os especialistas na técnica serão capazes de seleccionar de entre vários modificadores de resposta biológica para criar uma função efectora desejada que aumente a eficácia do anticorpo monoclonal da invenção.

Quando o anticorpo monoclonal da invenção é utilizado em combinação com vários agentes terapêuticos, tais como os aqui descritos, a administração do anticorpo monoclonal e o agente terapêutico usualmente ocorre substancialmente contemporaneamente. O termo "substancialmente contemporaneamente" significa que o anticorpo monoclonal e o

f. l. A

agente terapêutico são administrados razoavelmente próximo um do outro em relação ao tempo. Usualmente, é preferível administrar o agente terapêutico antes do anticorpo monoclonal. Por exemplo, o agente terapêutico pode ser administrado 1 a 6 dias antes do anticorpo monoclonal. A administração do agente terapêutico pode ser diária ou a qualquer outro intervalo, dependendo de factores tais como, por exemplo, a natureza do tumor, a condição do doente e a semi-vida do agente.

Utilizando os anticorpos monoclonais da invenção é possível conceber terapias combinando todas as características aqui descritas. Por exemplo, numa dada situação pode ser desejável administrar um agente terapêutico, ou agentes, antes da administração dos anticorpos monoclonais da invenção em combinação com células efectoras e o mesmo ou diferente agente terapêutico, ou agentes. Assim, pode ser desejável tratar doentes com leucemia ou linfoma, primeiro administrando interferão gama e interleuquina-2 diariamente durante 3 a 5 dias, e no dia 5 administrar o anticorpo monoclonal da invenção em combinação com células efectoras bem como com interferão gama e interleuquina-2.

Também é possível utilizar lipossomas com os anticorpos monoclonais da invenção na sua membrana para distribuir especificamente o lipossoma à área de células com doença associada a EBV. Estes lipossomas podem ser produzidos de modo a conterem, adicionalmente ao anticorpo monoclonal, agentes imunoterapêuticos tais como os descritos acima que seriam então libertados no sítio do tumor (Wolff, et al., *Biochemical et Biophysical Acta*, 802:259, 1984).

Os intervalos de dosagem para a administração dos anticorpos monoclonais da invenção são suficientemente grandes para produzir o efeito desejado no qual os sintomas da doença

f l a

associada a EBV são melhorados. A dosagem não deve ser tão grande que cause efeitos colaterais adversos, tais como reacções cruzadas indesejáveis, reacções anafilácticas, e afins. A dosagem variará geralmente com a idade, condição, sexo e extensão da doença no doente e pode ser determinada por um especialista na técnica. A dosagem pode ser ajustada pelo médico pessoal no caso de qualquer complicação. A dosagem pode variar desde cerca de 0,1 mg/kg até cerca de 2000 mg/kg, preferencialmente cerca de 0,1 mg/kg até cerca de 500 mg/kg, em uma ou mais doses de administração diárias, durante um ou vários dias. Geralmente, quando os anticorpos monoclonais da invenção são administrados conjugados com agentes terapêuticos, podem ser utilizadas dosagens mais baixas em comparação com as utilizadas para imunodiagnóstico *in vivo* com processamento de imagem.

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser administrados parentericamente por injeccção ou por perfusão gradual ao longo do tempo. Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser administrados intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, sub-cutaneamente, intracavidade, ou transdermicamente, isolados ou em combinação com células efectoras. As preparações para administração parentérica incluem soluções estéreis aquosas ou não aquosas, suspensões e emulsões.

Exemplos de solventes não aquosos são propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais tais como azeite, e ésteres orgânicos injectáveis tais como oleato de etilo. Transportadores aquosos incluem água, soluções alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões incluindo salino e meios tamponados. Veículos parentéricos incluem solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer com lactato, ou óleos fixos. Veículos intravenosos incluem reabastecedores de fluido e de nutriente, reabastecedores de electrólito (tais como os baseados em dextrose de Ringer), e afins. Podem também estar

presentes conservantes e outros aditivos, tais como, por exemplo, antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes e gases inertes e afins.

A invenção também se refere a um método para preparar um medicamento ou composição farmacêutica compreendendo um polipéptido, ou um anticorpo monoclonal da invenção, sendo o medicamento utilizado para terapia de doença associada a EBV.

A reactividade de uma amostra com péptidos EA-D, 50.10 ou anticorpos anti-péptido EA-D está preferencialmente associada a carcinoma nasofaríngeo e mononucleose infecciosa. De igual modo, a reactividade com péptidos EA-R, 17.1 ou anticorpos anti-péptido EA-R está preferencialmente associada a linfomas. Estes péptidos específicos e os seus anticorpos monoclonais correspondentes são particularmente úteis para detectar as transições EA-D e EA-R associadas a um estado de doença particular.

A revelação acima descreve a presente invenção de um modo geral. Pode ser obtida uma compreensão mais completa com referência aos seguintes exemplos que são fornecidos apenas para efeito de ilustração e não se pretende que limitem o âmbito da invenção.

#### EXEMPLO 1

#### SÍNTESE DO POLIPÉPTIDO p17

Foram identificados epitopos potenciais de células T na proteína p17 utilizando o algoritmo de Berzofsky (Programa AMPHI) (1987). Este algoritmo postula que as células T interagem preferencialmente com péptidos que são anfipáticos e que formam uma configuração de hélice alfa. Com base nessas características, os epitopos candidatos na proteína p17 foram mapeados e foram encontrados espalhados ao longo da molécula. Os

f l A

epitopos com os valores anfipáticos mais elevados foram sintetizados e empregues nos estudos. De entre 8 epitopos previstos em p17 foram sintetizados os 3 com valores mais elevados como 15 resíduos de aminoácidos com base nas sequências nucleotídicas que codificam para esses epitopos putativos (Figura 1, Tabela 1). A síntese de péptidos foi realizada utilizando o método de fase sólida de Merrifield (1963) num sintetizador de péptidos automatizado Applied Biosystems ABI 430-A, utilizando activação com hidrato de hidroxibenzotriazole/diciclohexilcarbodiimida como descrito (Curtiss, L.K., et al., *J. Biol. Chem.*, 263:13779-13785, 1988). As resinas de péptido resultantes foram tratadas com anisole/fluoreto de hidrogénio a 10% a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora (Lenard, J., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 89:181-182, 1967). As preparações de péptido (10  $\mu\text{g}$  por aplicação) foram analisadas por HPLC utilizando uma coluna VYDAC  $\text{C}^{18}$ . O tampão inicial continha ácido trifluoroacético a 0,1% em água (solvente A) e ácido trifluoroacético a 0,1% em acetonitrilo (solvente B). A aplicação consistiu num aumento de gradiente de 20-70% em solvente B durante 20 minutos a  $40^{\circ}\text{C}$ . As separações foram monitorizadas a uma absorvância de 214 nm. A purificação preparativa dos péptidos empregou cromatografia num HPLC preparativo WATERS AUTO 500 (coluna VYDAC  $\text{C}^{18}$  de 50 x 250 mm, 15-20  $\mu\text{m}$ ) nas mesmas condições descritas para cromatografia analítica. As composições de aminoácidos de todos os péptidos foram determinadas após hidrólise com um analisador de elevado desempenho Beckman 6300, com padrões internos. Todos os péptidos foram liofilizados e armazenados sob vácuo.

f l A

**TABELA 1**  
**SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS**  
**DA REGIÃO DO ANTIGÊNIO PRECOCE (EA-R) DE 17 Kd**

Péptido	Sequências de Aminoácidos	Localização <sup>a</sup>	
		Genômico	Péptido
p17.1	ETFTETWNRFITHTE	54,562 - 54,604	62-76
p17.2	GMLEASEGLDGWIHQ	54,766 - 54,808	130-144
p17.3	HQQGGWSTLIEDNIP	54,805 - 54,847	143-157
p17.1 <sup>b</sup>	QNSETFTETWNRFITHTEHVD	54,553 - 54,613	59-79

<sup>a</sup> Localização baseada na posição prevista de nucleótidos no protótipo EBV (B95.8) da sequência de ADN de Baer *et al.*, (*Nature*, 310:207, 1984).

<sup>b</sup> Extensão de p17.1 e p50.10, respectivamente, pela adição de vários aminoácidos dos terminais amino e carboxilo.

## EXEMPLO 2

### RESPOSTA PROLIFERATIVA DE PBL A PÉPTIDOS SINTÉTICOS

Células. A linha celular P<sub>3</sub>HR-1, estabelecida a partir de uma biopsia de linfoma Africano de Burkitt (ABL), foi a fonte do componente nativo de p17 do complexo EA-R nessas experiências (Himuna, Y., et al., *J. Virol.*, 1:1045-1051, 1967). As células foram cultivadas na presença de meio RPMI 1640 suplementado com soro de vitela fetal (FCS) a 10% inativado por calor (56°C, 30 minutos), L-glutamina a 2 mM e 50 µg por ml de gentamicina, a 37°C. As células foram passadas para meio fresco a cada 3-4 dias por diluição, para uma concentração de células de 5x10<sup>5</sup> células por ml.

Para a produção de antigénio as células P<sub>3</sub>HR-1 foram activadas com 20 ng por ml de TPA (acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol-13) e butirato de sódio a 3 mM durante 48 horas. Este procedimento resulta geralmente na indução de expressão deste antigénio em mais do que 70% das células, como determinado por imunofluorescência (Pearson et al., *Virol.*, 160:151-161, 1987).

ELISA. O ELISA para medição de anticorpos específicos para p17 ou para péptidos sintéticos foi realizado como previamente descrito em detalhe (Luka et al., *J. Immunol. Methods*, 67:145-156, 1984). As fracções de diferentes concentrações de antigénio foram diluídas em tampão Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 0,5 M, pH 9,5, adicionado aos poços em placas de microtitulação de poliestireno (Linbro) e as placas foram incubadas durante a noite a 4°C. Após este período de incubação as placas foram lavadas 5 x com Tris-HCl a pH 7,4, contendo Tween 20 a 0,05%, NaCl a 50 mM e 100 mg por litro de albumina (Sigma) e secas durante 20 minutos à temperatura ambiente. As placas foram pesquisadas com diferentes soros humanos positivos para anticorpos anti-EA-R ou EA-D e o anticorpo monoclonal para p17 para identificar a concentração

f. L. A.

óptima de antigénio para ser utilizada nos estudos serológicos. Foi utilizado como indicador do sistema IgG anti-humano de cabra (Sigma) ou IgG anti-murganho de cabra (Sigma) marcados com fosfatase alcalina.

Para testar soros humanos para anticorpos contra p17 nativa ou contra os péptidos sintéticos, os soros foram diluídos 1:10 em tampão de ELISA, adicionados em volumes de 0,1 ml aos poços revestidos com concentrações óptimas de antigénio e as placas foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente. Após 4 lavagens com tampão de ELISA, foi adicionado a cada poço 100  $\mu$ l de IgG anti-humano de cabra marcado com fosfatase alcalina, em tampão de ELISA e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 hora. Após mais quatro lavagens em tampão a reacção enzimática foi realizada dissolvendo 1 mg por ml de substrato de fosfatase alcalina da Sigma em tampão de dietanolamina a 1 M, pH 10,4, contendo  $MgCl_2$  a 1 mM e  $ZnCl_2$  a 0,1 mM e 100  $\mu$ l da mistura foram então adicionados a cada poço. A reacção foi deixada a decorrer durante 30 minutos a 37°C e então as placas foram pesquisadas directamente com um leitor de microplacas, TITERTEK MULTISKAN MC (Flow), a 420 nm. As leituras acima de 0,1, que era duas vezes o branco observado com soro negativo para o anticorpo, foram consideradas reacções positivas.

Purificação de p17 nativa. As células expressando p17 foram lavadas duas vezes em salino tamponado com fosfato (PBS), ressuspendidas num tampão de extracção contendo NP-40 a 0,5% e desoxicolato de sódio a 0,5% em Tris-hidrocloreto a 0,02 M (pH 7,4), NaCl a 0,15 M,  $\beta$ -mercaptoetanol a 1 mM e fluoreto de fenilmetil-sulfonilo (PMSF) a 10 mM e sonicadas durante 5 ciclos de 20 segundos cada. Os extractos foram então clarificados por centrifugação a 40 000 X g durante 60 minutos a 4°C num rotor Beckman JA-20 e o sobrenadante livre de células resultante foi

passado por uma coluna de afinidade preparada com um anticorpo monoclonal contra p17 (Pearson et al., *Cancer*, 51:260-268, 1983). A coluna foi lavada uma vez com 5 volumes de tampão de extração e depois uma vez com tampão sem detergentes antes da eluição da p17 ligada com  $MgCl_2$  a 3 M tamponado com Tris-HCl a 20 mM (pH 7,4). Os eluatos foram testados quanto à especificidade para transferência de Western e ELISA e titulados para actividade específica para o antigénio por ELISA (Luka et al., *J. Immunol. Methods*, 67:145-156, 1984). As concentrações de proteína foram determinadas utilizando o ensaio da Bio-Rad. Os eluatos contendo p17 foram então dialisados contra 100 volumes de Tris-HCl a 10 mM (pH 7,4), NaCl a 150 mM, seguido por diálise contra meio RPMI 1640 contendo soro negativo para o anticorpo A EBV humano a 10%. O antigénio foi dividido em fracções e armazenado a  $-70^{\circ}C$  até ser utilizado nos diferentes ensaios imunológicos.

Ensaio de proliferação. Os ensaios de proliferação de células T utilizando o polipéptido de p17 nativa ou os péptidos sintéticos foram realizados como previamente descrito em detalhe (Pothen et al., *Int. J. Cancer*, 49:656-660, 1991). Resumidamente, foram isolados linfócitos de sangue periférico (PBLO de dadores seropositivos) em gradientes de FICOLL-HYPAQUE, lavados e ressuspendidos em meio RPMI 1640 contendo soro  $A^+$  humano inactivado por aquecimento a 10%, de um dador seronegativo. As células ( $1 \times 10^5$  por 0,1 ml) foram então adicionadas a cada poço em placas de cultura de tecidos de 96 poços de fundo curvo (Costar, Cambridge, MA). As diferentes preparações de antigénio foram adicionadas a poços em triplicado em volumes de 0,1 ml e as placas foram incubadas a  $37^{\circ}C$  durante 5 dias. Foi adicionada  $^3H$ -timidina (5 Ci por mM) a uma concentração de 1  $\mu Ci$  por poço durante as últimas 4 horas de cultura. As células foram então recolhidas com um recuperador de amostras multicanal e a incorporação de  $^3H$ -timidina foi determinada utilizando um

contador de cintilações em líquido Beckman Modelo LS 3801. Os índices de estimulação para os antigénios teste foram calculados dividindo as contagens médias por minuto (CPMO para os antigénios teste pelas CPM médias dos poços controlo do meio).

Os PBL de indivíduos infectados com EBV assintomáticos foram testados em relação à resposta a qualquer dos três péptidos sintéticos de p17 (Tabela 1) através de um ensaio de proliferação utilizando linfócitos que previamente demonstraram proliferar na presença de p17 nativa (Pothen et al., *Int. J. Cancer*, 49:656-660, 1991). Foram incubadas com os PBL diferentes concentrações dos péptidos sintéticos durante 5 dias e a proliferação foi então ensaiada através da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. Os resultados desta experiência inicial utilizando PBL de um dador positivo para anti-VCA, positivo para anti-EA, são apresentados na Tabela 2. A p17 nativa purificada a partir de células P<sub>3</sub>HR-1 activadas originaram um S.I. de 15,8 nesta experiência. A concentrações de 50 e 12,5 µg por ml, o péptido de p17.1 também induziu respostas de proliferação significativas (S.I.'s de 10,8 e 4,7, respectivamente). Nenhum dos outros péptidos sintéticos induziu uma resposta de proliferação nas concentrações testadas. PBL de um indivíduo negativo para anticorpo EBV também não produziu resposta para nenhum dos péptidos sintéticos.

PBL de 3 indivíduos positivos anti-VCA negativos anti-anticorpo EA foram também examinados no ensaio de proliferação com os três péptidos sintéticos. Estes resultados são apresentados na Figura 2. Novamente, todas as 3 preparações de PBL responderam às concentrações mais elevadas de p17.1 com S.I.s variando entre 3,5-11. Duas das preparações (Fig. 2A,C) também proliferaram na presença de baixas concentrações de antigénio com S.I.s de 3 e 5, respectivamente. Nenhuma destas preparações de PBL proliferaram na presença de p17.2 e p17.3. Estas experiências

f. l. A

estabeleceram que os linfócitos T de indivíduos infectados com EBV, independentemente da presença de anticorpo contra EA, reconheceram um epitopo dominante em p17.

f l A

**TABELA 2**  
**RESPOSTA DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE**  
**UM DADOR INFECTADO COM EBV A PÉPTIDOS DE P17 SINTÉTICOS**

Antigénio <sup>1</sup>	Concentração (µg/ml)	Incorporação de <sup>3</sup> H-timidina (cpm±D.P.)	S.I.
-	-	147 ± 78	-
PHA	10	391567 ± 55800	-
p17 nativa <sup>2</sup>	35	2327 ± 73	15,8
p17.1	50	1584 ± 37	10,8
	12,5	689 ± 88	4,7
	3,12	263 ± 57	1,8
p17.2	50	277 ± 175	1,9
	12,5	278 ± 58	1,9
	3,12	157 ± 23	1,1
p17.3	50	190 ± 47	1,3
	12,5	132 ± 3	0
	3,12	194 ± 65	1,3

<sup>1</sup> O antigénio foi incubado durante 5 dias com  $1 \times 10^5$  linfócitos. As contagens por minuto (cpm) ± desvio padrão (D.P.) determinadas a partir de culturas em triplicado.

<sup>2</sup> Purificado a partir de células P<sub>3</sub>HR-1 por cromatografia de imunoafinidade.

**EXEMPLO 3**  
**FRACCIONAMENTO DE PBL EM SUBPOPULAÇÕES CD4<sup>+</sup> E CD8<sup>+</sup>**

f l A

PBL enriquecidos em subpopulações de células T foram isolados por depleção de uma população particular por toxicidade mediada por anticorpo/complemento. As células  $CD4^+$  foram preparadas por lise das células  $CD8^+$  com um anticorpo anti- $CD8$  e complemento de coelho enquanto a subpopulação de células T  $CD8^+$  foi enriquecida por lise de células  $CD4^+$  com um anticorpo anti- $CD4$  e complemento de coelho.

Os PBL foram ressuspensos em meio RPMI-1640 contendo L-glutamina a 2 mM, HEPES a 25 mM, e gentamicina a 10  $\mu$ g por ml (meio HEPES) a uma concentração de  $20 \times 10^6$  células por ml. MAB específico de células T, OKT4 ou OKT8 (Ortho Diagnostics Inc.), foi adicionado às células à concentração óptima (previamente determinada por titulação de modo a produzir lise máxima) e incubada em gelo durante 30 minutos. As células foram então lavadas com meio HEPES fresco e ressuspensas a  $10 \times 10^6$  células por ml em complemento de coelhos bebês (Pel-Freez Clinical Systems) diluída com o meio HEPES à concentração apropriada (previamente ensaiada para produzir citotoxicidade anticorpo-específica máxima). As células foram incubadas durante 45 minutos num banho de água a  $37^\circ\text{C}$  com agitação suave a cada 15 minutos. Após incubação, as células foram lavadas exaustivamente com o meio HEPES e uma fracção de células ( $1-2 \times 10^6$ ) foi removida e corada para análise de citometria de fluxo que foi efectuada como abaixo descrito. Os PBL que não foram incubados com nenhum anticorpo ou complemento foram também processados em paralelo para citometria de fluxo de modo a calcular a percentagem original de células  $CD4^+$  e  $CD8^+$  em cada dador. As populações que produziram pureza  $> 95\%$  e viabilidade foram utilizadas em ensaios de proliferação.

Os ensaios de proliferação utilizando PBL enriquecidos em  $CD4^+$  e  $CD8^+$  a partir de dadores seropositivos foram conduzidos variando as concentrações dos péptidos sintéticos como acima descrito.

f l A

No entanto, nestas experiências, PBL autólogos adicionalmente irradiados foram utilizados como células de apresentação de antigénio (APC) a uma razão de  $5 \times 10^5$  de células  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ .

Análise FACS. As células removidas após incubação acima ( $1-2 \times 10^6$ ), foram coradas durante 45 minutos a  $4^\circ C$  com 20  $\mu l$  de reagente SIMULTEST (Becton-Dickinson) contendo isotiocianato de fluoresceína conjugado com anti-leu 3a (marcador  $CD4$ ) e ficoeritrina conjugada com anti-leu 2a (marcador  $CD8$ ). As células foram lavadas exaustivamente, ressuspendidas em RPMI-1640 com FCS a 5% e azida de sódio a 0,02% e analisadas com o separador mecânico de células (FACSTAR Plus, Becton-Dickinson).

Para determinar se ambas as subpopulações de células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  eram correspondentes a p17.1, foram separados linfócitos de dois dadores nestas duas subpopulações, que foram então empregues no ensaio de proliferação. Os resultados são apresentados na Figura 3. Os PBL de ambos os dadores proliferaram na presença de p17.1 às concentrações testadas nesta experiência (100  $\mu g$  por ml de dador A e 50  $\mu g$  por ml de dador B). A subpopulação de  $CD4^+$  do dador A também respondeu vigorosamente a diferentes concentrações de p17.1 com S.I.s tão elevados quanto 5,3. A subpopulação de  $CD8^+$  deste dador não produziu resposta contra este péptido sintético. Este padrão de resposta também se observou com células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  fraccionadas, de outro dador seropositivo. Em contraste, tanto subpopulações de células T  $CD4^+$  como  $CD8^+$  do dador B responderam a p17.1 com as subpopulações  $CD8^+$  apresentando um S.I. mais elevado do que 3 na concentração de antigénio mais elevada testada (50  $\mu g$  por ml). Estes resultados indicaram assim que ambas as células T  $CD4^+$  e  $CD8^+$  reconheceram este epitopo de p17.

#### EXEMPLO 4

#### RESPOSTA SEROLÓGICA A EPITOPOS SINTÉTICOS DE p17

Foram designados estudos para determinar a reactividade serológica com os epitopos sintéticos de p17. Para este objectivo, 87 soros positivos para o anticorpo anti-EA (título > 160) foram testados no ELISA contra concentrações óptimas pré-determinadas (2 µg por poço) dos péptidos sintéticos de p17. Os soros foram obtidos a partir de 28 doentes com linfoma africano de Burkitt (ABL) recolhidos durante o Projecto do Tumor de Burkitt no Gana, e a partir de 28 doentes norte-americanos com célula grande intermédia ou linfoma não de Hodgkin de grau elevado (NANHL). Os dadores incluíram tanto indivíduos positivos para o HIV como negativos para o HIV. Adicionalmente, foram examinados neste estudo 31 doentes com carcinoma nasofaríngeo (NANPC) (Pearson, G.R., et al., *Cancer*, 51:260-268, 1983). Para validar a especificidade de EA das reacções serológicas, os resultados com estes soros foram comparados com resultados com soros negativos para anticorpos contra EA e 23 VCA e soros positivos para anticorpos contra 30 VCA e negativos para anticorpos contra EA. Os resultados estão apresentados na Figura 4. Em contraste com os resultados da proliferação de células T, todos os três péptidos sintéticos reagiram com o soro positivo para anticorpos contra EA a vários graus, com p17.1 a ser de novo o epitopo dominante. Aproximadamente 60% do soro positivo para anti-EA reagiu com p17.1, 48% com p17.2 e 23% com p17.3. A especificidade anti-EA destes resultados serológicos foi certificada pela ausência de reactividade de qualquer dos 53 soros negativos para anticorpos anti-EA com qualquer dos três péptidos sintéticos. Desta forma, estes resultados identificaram três epitopos de células B em p17.

Para determinar porque alguns soros com anticorpos anti-EA reagiram com estes péptidos sintéticos enquanto outros não, os

f l A

dados foram analisados de acordo com o soro dador. Estes resultados são apresentados na Figura 5. Foi notada uma especificidade notável com doentes com doenças linfoproliferativas que possuem normalmente anticorpos anti-EA-R no seu soro em oposição ao NPC positiva para anti-EA-D. Setenta e um por cento dos soros de doentes ABL e 93% dos soros de doentes com NANHL reagiram com p17.1 em oposição a 23% dos soros de doentes Norte Americanos com NPC. Uma especificidade semelhante foi notada com p17.2 e p17.3. Estes resultados demonstraram o valor potencial de um ou mais destes péptidos sintéticos para dosear anticorpos anti-EA-R no soro de doentes com doenças linfoproliferativas e estão sumarizadas na Tabela 3.

**Tabela 3**  
**SUMÁRIO DA REACTIVIDADE DO SORO COM PÉPTIDOS**  
**SINTÉTICOS EA-R 17 KD**

Dadores de soro	N° de positivos/N° testado		
	p17.1	p17.2	p17.3
Normal (VCA-EA-)	0/23 (0)	0/23 (0)	0/23 (0)
Normal (VCA+EA-)	0/30 (0)	0/30 (0)	0/30 (0)
Linfoma (total)	46/56 (82)	36/56 (64)	16/56 (29)
a) linfoma de Burkitt (Africano)	20/28 (71)	13/28 (46)	9/28 (32)
b) linfoma Não de Hodgkin (Norte Americano)	26/28 (93)	23/28 (82)	7/28 (25)
Carcinoma nasofaríngeo (Norte Americano)	7/31 (23)	6/31 (19)	4/31 (13)

<sup>1</sup> todos os dadores de soro com carcinoma nasofaríngeo e linfoma possuíam títulos de anticorpo para EA que eram >160 como determinado por imunofluorescência. Estes soros foram também positivos para anticorpos contra a proteína EA-R de 17 Kd purificada a partir de células P<sub>3</sub>HR-1 como determinado por ELISA.

**TABELA 4**  
**RESULTADOS DE EBV IM COM O PÉPTIDO EA 17.1**

AMOSTRA N°	D.O.	RESULTADO
2241	0,282	-
11984	0,542	+
12005	0,981	+
12288	0,700	+
12407	0,787	+
12409	0,592	+
12418	0,463	-
12498	0,637	+
12502	0,924	+
12587	0,571	+
12600	0,260	-
12611	0,259	-
12801	0,601	+
12828	0,375	-
12829	0,257	-
12836	0,692	+
12837	0,523	+
12840	0,488	-
12888	0,423	-
12889	0,574	+
12892	0,430	-
12893	0,592	+
12899	0,825	+
12900	0,264	-
13075	0,154	-
12419	0,655	+
13637	0,719	+
13769	0,757	+
13929	0,332	-
14043	0,095	-
14128	0,434	-
14131	0,182	-

% positivos 12/32 = 38%  
Resultados >0,5 foram considerados positivos (leituras de D.O. a 420 nm).

A reactividade serológica do péptido p17.1 que continha aminoácidos adicionais na sua extremidade amino e carboxílica foi testada em soros EBV IM agudo que foram positivos para EA. Os resultados ELISA apresentados na Tabela 5 indicam que os

f l A

aminoácidos adicionais melhoraram a reactividade para o péptido EA.

**TABELA 5**  
**COMPARAÇÃO DE PÉPTIDOS EA 17.1 E 50.1 COM EXTENSÕES EM EBV IM**  
**AGUDOS POSITIVOS PARA EA**

Amostra nº	EA-R	
	<u>17.1</u>	<u>17.1e</u>
2241	0,282	1,277
12498	0,837	0,502
12836	0,692	1,257

e = extensão como descrito na Tabela 1.

A reactividade serológica de soros de 1) negativos para anti-EA, negativos para VCA (antigénio da cápside viral); 2) linfomas positivos para anti-EA-R; e 3) carcinomas nasofaríngeos positivos para anti-EA-D foram estudados por ELISA. Como apresentado na Tabela 6, existe uma elevada correlação entre a reactividade de p17.1 e linfomas.

**TABELA 6**

f l A

REACTIVIDADE COMPARATIVA DE SOROS ANTI-EA-R E ANTI-EA-D  
CONTRA O PÉPTIDO SINTÉTICO EA-R (P17.1)

	<u>ELISA (420 nm)<sup>1</sup></u>
Dador de soro	p17.1
Negativo para anti-EA (VCA negativo)	0,071 0,027 0,024 0,041
Positivo para anti-EA-R (Linfomas)	0,682 1,354 1,793 1,218 1,056 1,104
Positivo para anti-EA-D (Carcinoma nasofaríngeo)	0,019 0,014 0,041 0,025 0,265 0,029

<sup>1</sup> Leituras de D.O. a 420 nm; valores acima de 0,2 foram considerados significativos.

EXEMPLO 5

DETECÇÃO DE TRANSIÇÃO PRECOCE DE ANTIGÉNIO D-R

A transição do antigénio precoce D-R foi seguida num doente durante o curso de uma mononucleose infecciosa aguda. Os anticorpos contra o péptido (EA-R) foram detectados por ELISA em amostras colhidas durante mais de seis meses. Os dados na Tabela 7 mostram que o péptido 17.1 apresenta um pico a 7-18-88. Deste modo, os péptidos da invenção são úteis para monitorizar o percurso da doença associada a EBV num doente.

TABELA 7

ELISA IgG: SOROS SEQUENCIAIS

IgG<sup>1</sup>

DATA	SORO N°	P17.1
5-26-88	9817	0,158
5-31-88	9820	0,106
6-07-88	9829	0,135
6-20-88	9941	0,169
6-27-88	9983	0,645
7-18-88	10064	0,842
8-29-88	10237	0,260
9-20-88	10271	0,231
10-21-88	10488	0,217
11-15-88	10546	0,193

<sup>1</sup>Leituras de D.O.; soros testados a uma diluição 1,20; (+) > 0,25.

### SUMÁRIO DAS SEQUÊNCIAS

A sequência ID N° 1 é a sequência de aminoácidos para o péptido p17.1, da região do antigénio precoce 17 Kd (EA-R) de EBV (Página 7, linha 3; Página 29, linha 11 na Tabela 1; Página 39, linha 8; e Página 41, linha 3).

A sequência ID N° 2 é a sequência de aminoácidos para o péptido p17.2, da região do antigénio precoce 17 Kd (EA-R) de EBV (Página 7, linha 3; Página 29, linha 12 na Tabela 1; Página 39, linha 8; e Página 41, linha 4).

A sequência ID N° 3 é a sequência de aminoácidos para o péptido p17.3, da região do antigénio precoce 17 Kd (EA-R) de EBV (Página 7, linha 3, Página 29, linha 13 na Tabela 1; e Página 41, linha 5).

f l a

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: JOHNSON & JOHNSON e GEORGETOWN  
UNIVERSITY

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: PÉPTIDOS IMUNORREACTIVOS DO VÍRUS  
EPSTEIN-BARR

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 3

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) ENDEREÇADO: Spenleys Horn jubas & Lubitz

(B) RUA: 1880 Century Park East - Suite 500

(C) CIDADE: Los Angeles

(D) ESTADO: Califórnia

(E) PAÍS: EUA

(F) CÓDIGO POSTAL: 90067

(v) FORMATO DE LEITURA EM COMPUTADOR

(A) TIPO DE MEIO: Disquete

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0,  
Versão #1.25

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

(A) NÚMERO DE PEDIDO: PCT/

(B) DATA DE ENTRADA: 15-SET-1993

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(viii) INFORMAÇÃO DO MANDATÁRIO/AGENTE:

(A) NOME: Wetherell, Jr., Ph.D., John R.,



f. l. A

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..15

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:2:

Gly	Met	Leu	Glu	Ala	Ser	Glu	Gly	Leu	Asp	Gly	Trp	Ile	His	Gln
1				5					10					15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOME/CHAVE: Péptido

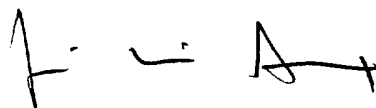
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..15

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO:3:

His	Gln	Gln	Gly	Gly	Trp	Ser	Thr	Leu	Ile	Glu	Asp	Asn	Ile	Pro
1				5					10					15

Lisboa, 30 de Agosto de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'F. U. A.', is written below the typed text.

## REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido consistindo essencialmente na sequência de aminoácidos

[XETFTETWNRFFITHTEY]n',  
[XGMLEASEGLDGWIHQY]n', ou  
[XHQQGGWSTLIEDNIPY]n',

em que X e Y são independentemente de 0 a cerca de 5 aminoácidos que ocorrem naturalmente, em que n é 1 até cerca de 1000, em que o polipéptido é capaz de se ligar a um anticorpo num espécimen de um indivíduo com doença associada ao vírus Epstein-Barr (EBV).

2. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, consistindo essencialmente na sequência de aminoácidos

[QNSETFTETWNRFFITHTEHVD]n',

em que n é 1 até cerca de 1000, em que o polipéptido é capaz de se ligar a um anticorpo num espécimen de um indivíduo com doença associada ao vírus Epstein-Barr (EBV).

3. Método *in vitro* para detectar anticorpos contra o polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, que compreende colocar em contacto um espécimen com o polipéptido e determinar se os anticorpos se ligam ao péptido.
4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o espécimen é sangue.
5. Método de acordo com a reivindicação 3 ou 4, em que o péptido é marcado de um modo detectável.

f l A

6. Método de acordo com a reivindicação 5, em que o marcador detectável é um radioisótopo, um composto fluorescente, um metal coloidal, um composto quimioluminiscente, um composto bioluminiscente, um composto fosforescente, ou uma enzima.
7. Método de acordo com a reivindicação 3 ou 4, em que o péptido está ligado a uma fase sólida.
8. Anticorpo monoclonal contra o péptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2.
9. Linha celular de hibridoma capaz de produzir o anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8.
10. Método *in vitro* de detecção de uma sequência de aminoácidos compreendendo o polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, compreendendo o referido método colocar em contacto um espécimen suspeito de conter a sequência de aminoácidos com o anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 7.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal é marcado de um modo detectável.
12. Método de acordo com a reivindicação 11, em que o marcador detectável é um radioisótopo ou um marcador paramagnético.
13. Utilização do anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8 para a preparação de uma composição de diagnóstico para detectar uma sequência de aminoácidos compreendendo o polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2 *in vivo*.
14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o anticorpo monoclonal é marcado de um modo detectável.

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o marcador detectável é um radioisótopo, um composto fluorescente, um metal coloidal, um composto quimioluminiscente, um composto bioluminiscente, um composto fosforescente, ou uma enzima.
16. Método de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal está ligado a uma fase sólida.
17. Polinucleótido que codifica para o polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou uma sequência polinucleotídica complementar a esta.
18. Composição farmacêutica compreendendo pelo menos uma dose de uma quantidade imunogenicamente eficaz de um polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou o anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8, num transportador farmacológico.
19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, em que o anticorpo monoclonal é humano.
20. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18 ou 19, para melhora de doença associada ao vírus Epstein-Barr (EBV) num animal.
21. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20, em que o anticorpo monoclonal é utilizado profilacticamente.
22. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 20 ou 21, em que a doença associada ao EBV é a mononucleose infecciosa ou linfoma de Burkitt.

23. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 20 a 22, para administração parentérica.
24. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 23, em que a administração parentérica é por injeção subcutânea, intramuscular, intraperitoneal, intracavidade, transdérmica, ou intravenosa.
25. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 24, para administração de uma dosagem de cerca de 0,01 mg/kg/dose até cerca de 2000 mg/kg/dose.
26. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 25, em que o anticorpo é administrado em combinação com células efectoras.
27. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 26, em que o anticorpo monoclonal é marcado terapeuticamente.
28. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 27, em que o anticorpo é administrado substancialmente contemporaneamente em combinação com um agente terapêutico.
29. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 27 ou 28, em que o marcador terapêutico é um radioisótopo, um fármaco, um imunomodulador, um modificador de resposta biológica, uma lectina, ou uma toxina.
30. Composição farmacêutica de acordo com qualquer das reivindicações 18 a 29, em que o anticorpo monoclonal é humano.

31. "Kit" compreendendo um polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 2 ou um anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 8.

Lisboa, 30 de Agosto de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

F. C. A. A.

f l A

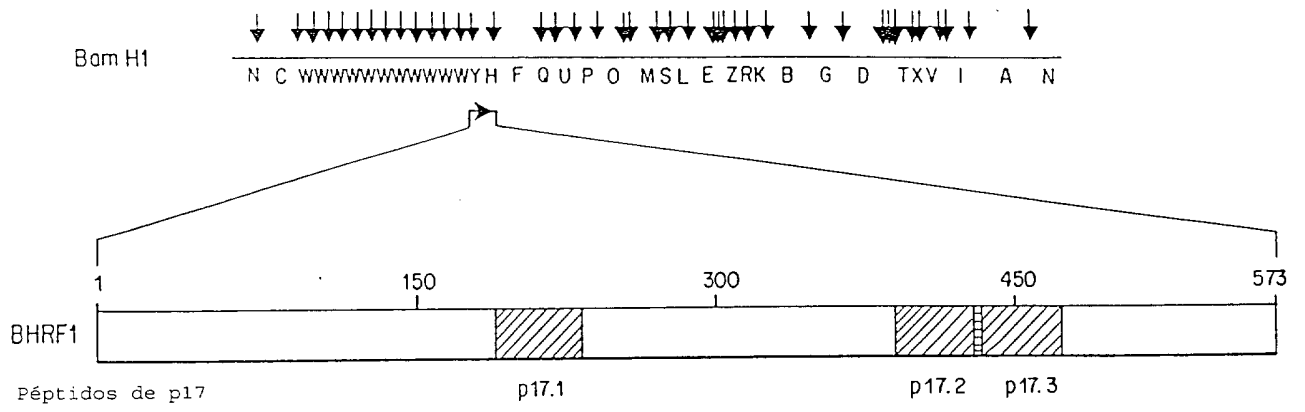


FIG.1

f. l. a.

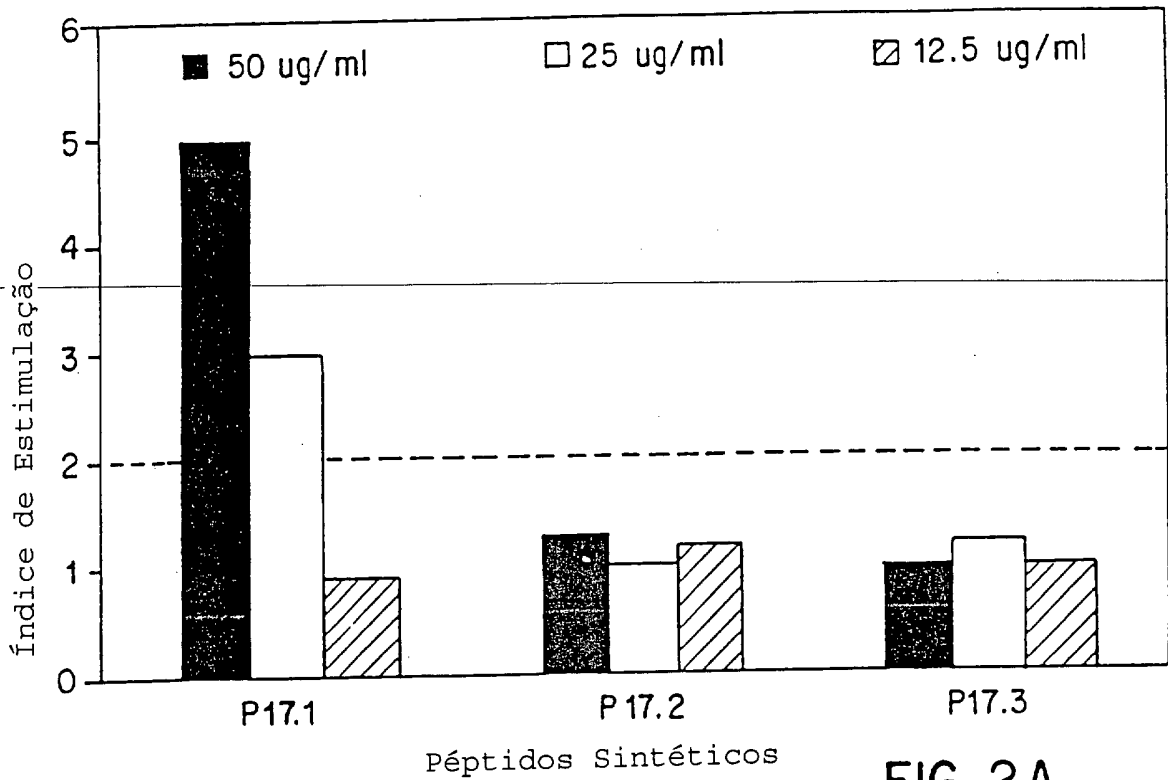


FIG. 2A

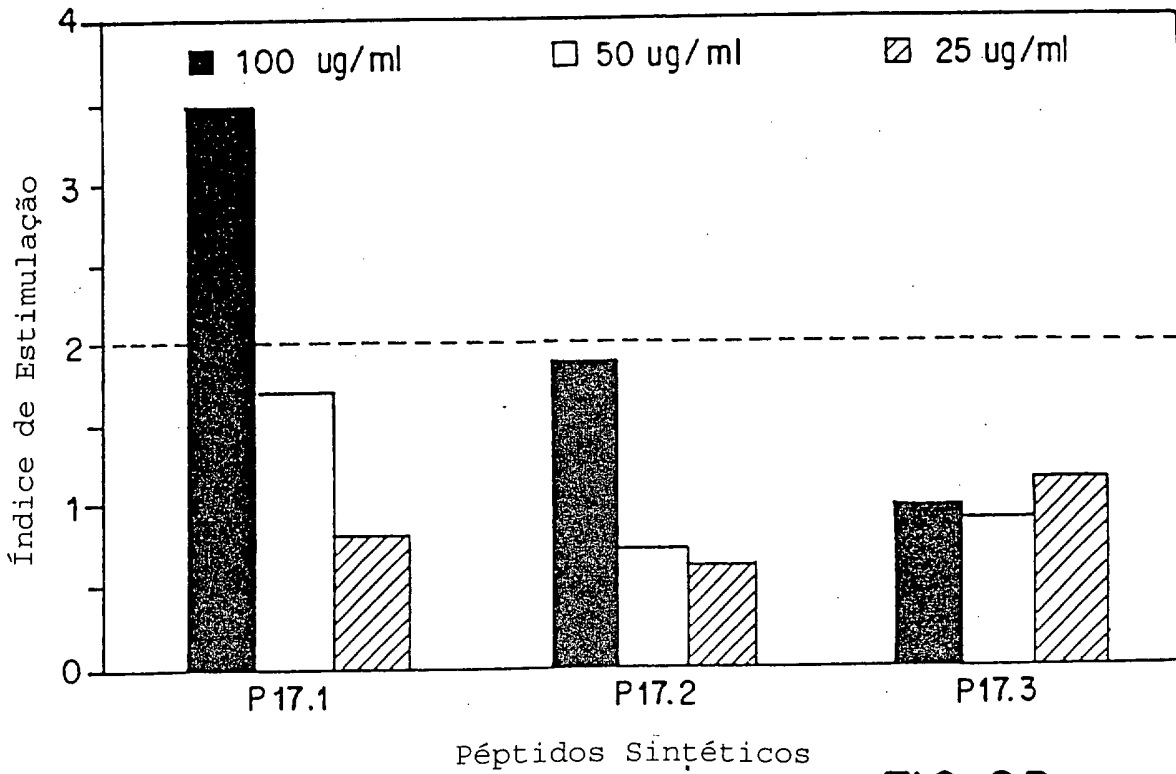


FIG. 2B

f u A

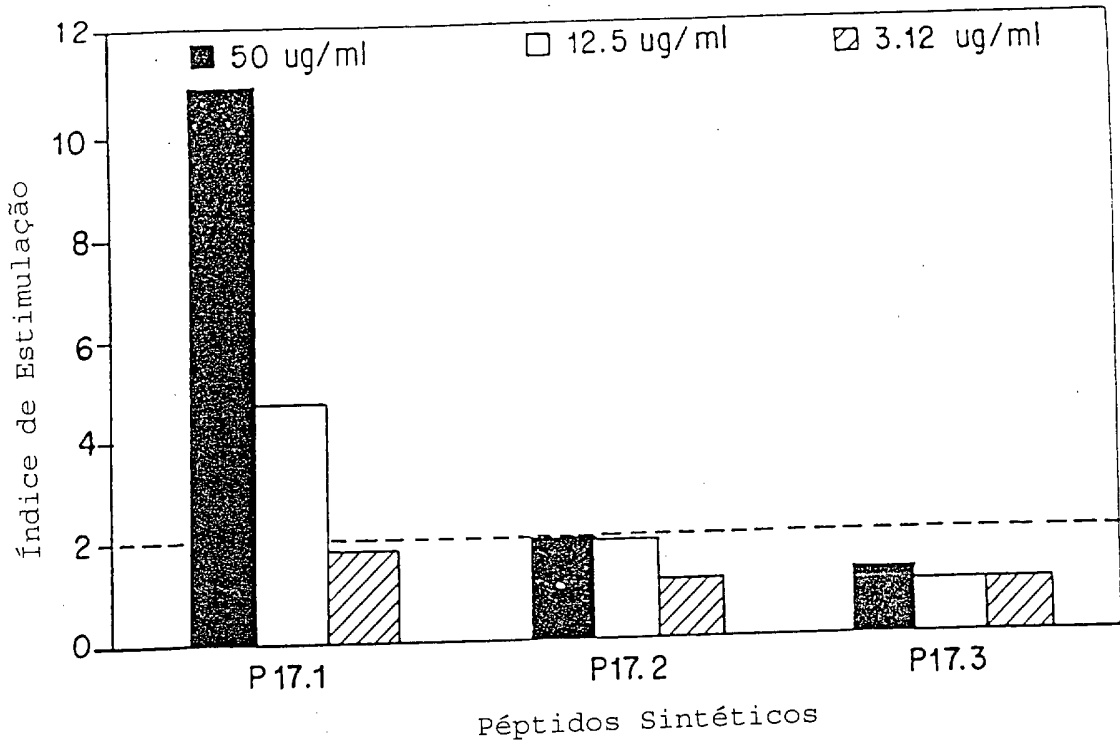


FIG. 2C

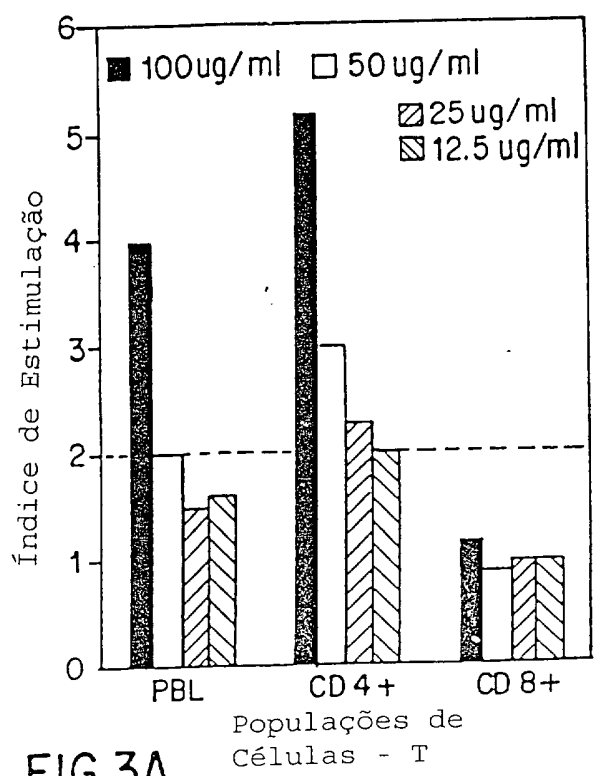


FIG.3A

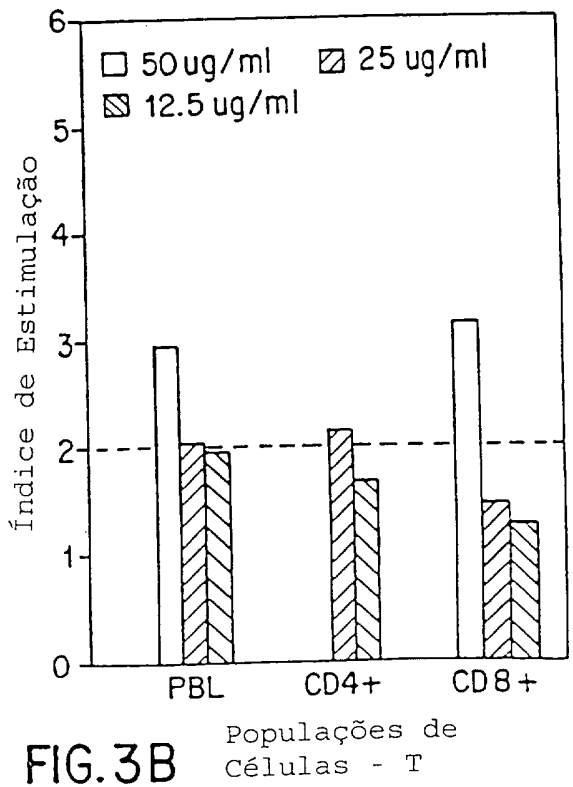


FIG.3B

f l A

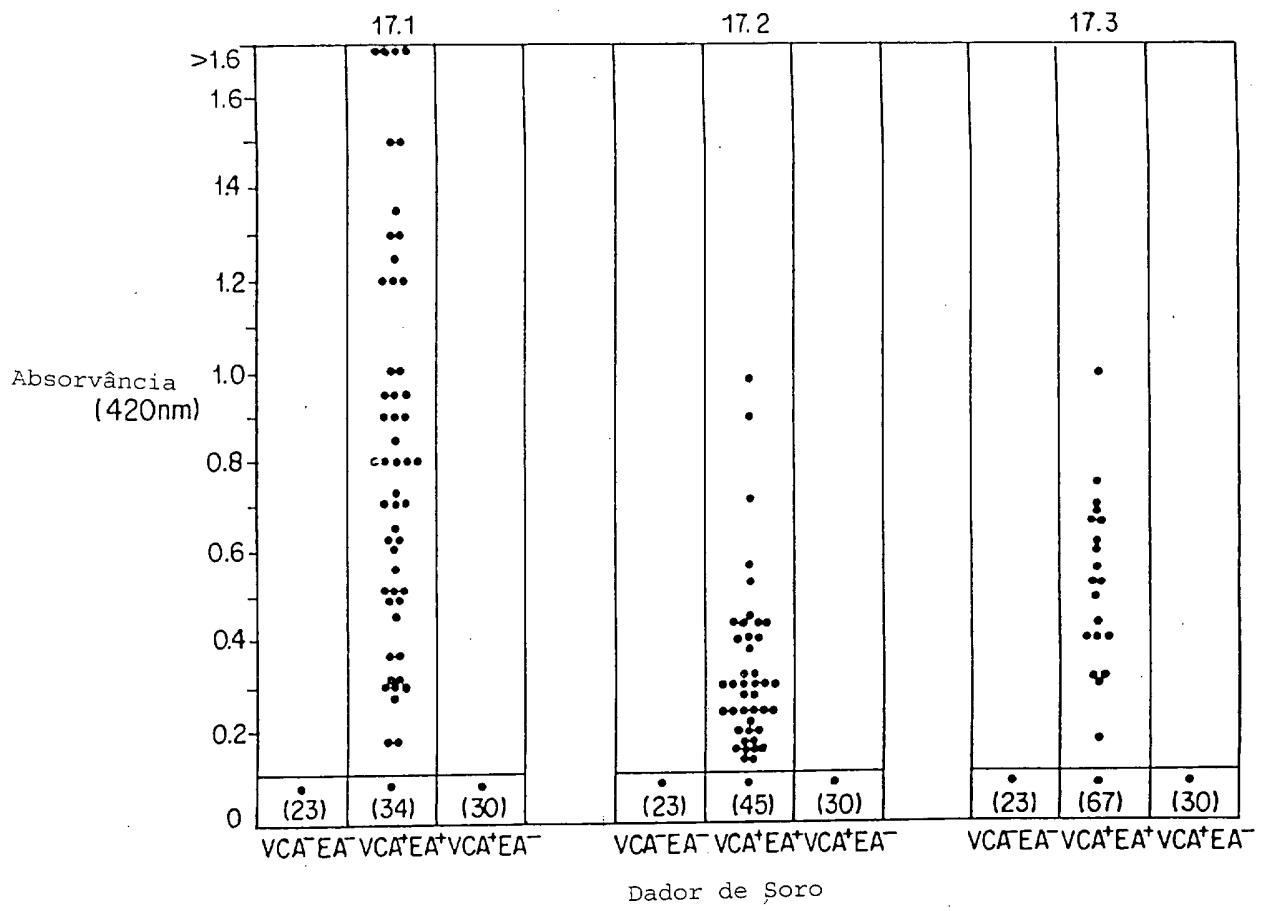


FIG. 4