

República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9607171-0 B1



* B R P I 9 6 0 7 1 7 1 B 1 *

(22) Data do Depósito: 18/11/1996

(45) Data de Concessão: 19/07/2016

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD6 HUMANO, USOS DOS MESMOS PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO DE PSORÍASE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E REAGENTE CONTENDO O DITO ANTICORPO

(51) Int.Cl.: C07K 16/28; C07K 16/46; G01N 33/577; A61K 39/395

(30) Prioridade Unionista: 17/11/1995 CU 120/95

(73) Titular(es): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR

(72) Inventor(es): JOSE ENRIQUE MONTERO CASIMIRO, JOSEFA LOMBARDERO VALLADARES, ROLANDO PEREZ RODRIGUEZ, PATRICIA SIERRA BLAZQUEZ, BLANCA ROSA TORMO BRAVO

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD6 HUMANO, USOS DOS MESMOS
PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO DE PSORÍASE, COMPOSIÇÃO FAR-
MACÊUTICA E REAGENTE CONTENDO O DITO ANTICORPO".

5 Campo Técnico

A presente invenção refere-se ao ramo da imunologia e em particular à obtenção de composições farmacêuticas que contêm um anticorpo monoclonal que reconhece o antígeno de diferenciação leucocitático
10 CD6.

Técnica Anterior

Os Anticorpos Monoclonais (AcM) permitiram a caracterização de moléculas de importância fisiológica expressas nas membranas celulares, definindo nas células do sistema imunológico os抗ígenos ou "Cluster de Diferenciação Leucocitáticos" (CD), (Schlossman, S. F. et al. (1994) Immunol. Today 15(3): 98). A definição do papel dos CD na diferenciação e maturação das células linfóides durante seu desenvolvimento ontogenético, os mecanismos de reconhecimento e adesão celular, os mecanismos de ativação e proliferação durante a resposta imunológica levaram ao emprego de seus respectivos AcMs no diagnóstico e imunoterapia, com resultados animadores (Dantil, J. et al. (1991) Curr. Opin. Immunol. 3: 740).

25 Os AcMs murinos direcionados contra moléculas expressas na membrana celular de linfócitos T humanos contribuíram para melhorar o diagnóstico de entidades clínicas onde o defeito funcional se localiza nestas células, além disso foram utilizados para explorar novos
30 enfoques terapêuticos com a finalidade de modular sua atividade funcional como na Rejeição de Transplantes, na

Doença do Enxerto versus Hospedeiro (GvHD) e nas Doenças Auto-imunes (Waldmann, T. A. (1991) Science 252: 1657; Waldmann, T. A. (1992) Annu. Rev. Immunol. 10: 675).

O CD6 é uma molécula pouco caracterizada. Sabe-se que é uma glicoproteína que existe em duas formas moleculares que se mantêm em equilíbrio dinâmico e diferem apenas no grau de fosforilação. Em linfócitos T em repouso ele é uma molécula fosforilada de 105 kDa e em células ativadas, uma forma hiperfosforilada de 130 kDa (Cárdenas, L. et al. (1990) J. Immunol. 145: 1450; Swack, J. A. et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 7137), membro de uma família de receptores de membrana e proteínas de secreção com estrutura característica (Kodama, T. et al. (1990) Nature 343: 531; Aruffo, A. et al. (1991) J. Exp. Med. 174: 949); é expresso na superfície de timócitos humanos maduros, em linfócitos T do sangue periférico, onde constitui a maior parte da população de células CD3+, em um subtípo de linfócitos B e nos neurônios do córtex cerebral, nos linfócitos T do sangue periférico, participa dos mecanismos de ativação celular (Reinherz, E. L. et al. (1982) Cell 30: 735; Kamoun, M. et al. (1981) J. Immunol. 127: 987; Mayer, B. et al. (1990) J. Neuroimmunol. 29: 193; Rasmussen, R. A. et al. (1994) J. Immunol. 152: 527).

25 Não se conhece o papel do CD6 na ontogenia das células T, assim como sua possível função na fisiopatologia de doenças de diferentes etiologias.

Foi recentemente identificado e caracterizado um

ligador do CD6 com ampla distribuição celular em tecidos normais como timo, baço, gânglios linfáticos e pele (Dhavalkumar, D. P. et al. (1995) J. Exp. Med. 181: 1563). Esta molécula, denominada ALCAM Molécula de Adesão de Célula de Leucócito Ativado (Activated Leukocyte-Cell Adhesion Molecule) por sua expressão em linfócitos T e B ativados assim como em monócitos, é uma glicoproteína de membrana tipo I de 100 kDa de peso molecular, com 5 domínios extracelulares similares aos das imunoglobulinas, pode apresentar diferentes graus de ativação dependendo de cátions divalentes e pode mediar interações homofílicas e heterofílicas (Bowen, M. A. et al. (1995) J. Exp. Med. 181: 2213).

Em clínica foram utilizados diferentes ACMs anti-CD6 na prevenção de rejeição aguda de transplante de órgãos (Kirkman, R. L. et al. (1983) Transplantation 36: 620) e para remover linfócitos T dos transplantes de medulas ósseas para prevenir contra a Doença do Enxerto versus Hóspedeiro (GvHD) (Soiffer, R. J. et al. (1992) J. Clin. Oncol. 10:1191). O ACM ior t1 é encontrado em Ensaio Clínico Fase II no tratamento dos linfomas de células T cutâneos (Garcia, C. A. et al. (1990) Biotec. Aplicada 7(2): 176; Faxas, M. E. et al. (1993) Biotec. Aplicada 10(1): 20).

O anticorpo monoclonal murino ior t1 de isótipo IgG2a, classificado como anti-CD6 no IV Seminário Internacional de Antígenos de Diferenciação Leucocitático de Viena (1989), define um epitopo diferente daqueles reco-

nhecidos por outros AcM anti-CD6 que tem configuração estável e insensível a agentes redutores, possivelmente localizado na estrutura primária da molécula CD6 (Osorio, L. M. et al. (1994) *Cell. Immunol.* 154: 123).

Este anticorpo monoclonal tem um reconhecimento inferior ao de outros anti CD3 em células mononucleares periféricas de indivíduos saudáveis; o reconhecimento do ior tl em linhagens celulares humanas em cultura de origem T é em Jurkat 47%, Molt-4 (23%), CCRF-CEM (não se reconhece); de origem B em Raji (9%), origem eritroblastóide K-562 (12%) e mielomonocítica U-937 (9%), assim como também reconhece células mononucleares periféricas de pacientes com leucemia linfocítica crônica B ($89 \pm 4\%$) (García, C. A. et al. (1992) *Biotec. Aplicada* 9(1): 70) e linfócitos de lesões cutâneas de pacientes com linfomas cutâneos de células T (Rodriguez, T. et al. (1985) *Interferón y Biotec.* 2(1): 41).

O AcM ior tl não inibe "in vitro" a citotoxicidade celular antígeno específica (Faxas, M. E. et al. (1993) *Biotec. Aplicada* 10(1): 47) e é capaz de ativar "in vitro" linfócitos T do sangue periférico de indivíduos saudáveis, a concentrações subótimas de OKT3 (anti CD3) a reticulação com o ior tl induz respostas superiores que as obtidas com outros AcM anti-CD6 (Osorio, L. M. et al. (1994) *Cell. Immunol.* 154: 123).

A psoriase é uma doença cuja patologia ainda não está definida (Hunziker, T. et al. (1993) *Ther. Umsch.* 50(2): 110; Elder, J. T. et al. (1994) *J. Invest. Dermatol.*

tol, 102(5): 24S); caracteriza-se por apresentar um infiltrado inflamatório no órgão alvo com predomínio de linfócitos T ativados com fenótipo CD4+ e CD8+ (Chang, J. C. C. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 9282). bem como acentuada oligoclonalidade dos receptores de células T. Estas células ao que parece apresentam tendência acentuada para migrar para a pele (homing) (Barker, J. N. W. N. et al. (1992) Br. J. Dermatol. 127: 205; Menssen, A. et al. (1995) J. Immunol. 155: 4078; Valdirmarsson, H. et al. (1995) Immunol. Today 16(3): 145).

A remissão espontânea da psoriase pode ser prevista se o número de células T na pele estiver reduzido, o que sugere que desempenham um papel importante na perpetuação da doença ao liberar mediadores solúveis de resposta imunológica capazes de induzir a proliferação de queratinócitos, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença.

Estas considerações encontram apoio em fatos como a cura da doença pós-transplante de medula óssea alogênico, a provável associação HLA, a melhora com esteroides e sobretudo com imunomoduladores como a ciclosporina e a melhora clínica com anticorpos monoclonais (AcM) terapêuticos anti-células T, ainda que de forma reversível (Griffiths, C. E. M. et al. (1992) Springer Semin Immunopathol 13: 441; Nanney, L. B. et al. (1986) J. Invest. Dermatol. 86(3): 260; Picassia, D. D. et al. (1987) J. Am. Acad. Dermatol. 17(3): 408; Schopf, R. E. et al. (1986) Arch. Dermatol. Res. 279(2): 89; van de Kerkhof,

P. C. et al. (1987) Dermatológica 174(5): 224).

O sucesso da imunoterapia com anticorpos monoclonais depende da seleção da molécula alvo, que deve interferir nas funções celulares importantes ou da seleção do AcM (Dantal, J. et al. (1991) Curr. Opin. Immunol. 3: 740). Os AcMs avaliados na psoriase direcionados contra o CD3 (Weinshenker, B. G. et al. (1989) J. Am. Acad. Dermatol. 20: 1132) e contra o CD4 (Poizot-Martin, I. et al. (1991) Lancet 337: 1477; Prinz, J. et al. (1991) Lancet 10 338: 320; Nicolas, J. F. et al. (1991) Lancet 338: 321) levaram a uma melhora clínica nos pacientes depois de múltiplas aplicações endovenosas em doses elevadas, com remissões de curta duração e recaída precoce dos sintomas e sinais da doença em todos os casos.

A aplicação terapêutica de anticorpos monoclonais murinos em múltiplas doses associa-se ao aparecimento de efeitos indesejáveis no paciente devido à xenogenicidade das proteínas murinas que implica no aparecimento da resposta de anticorpos humanos contra as imunoglobulinas murinas (Anticorpos anti-rato humano (Human Anti-Mouse Antibodies) - HAMA); pelo que a humanização dos AcM utilizando a engenharia de proteinas garante a redução de sua imunogenicidade, melhora em sua farmacocinética e da eficácia clínica (Winter, G. et al. (1993) Trends-20 Pharmacol-Sci. 14(5): 139).

Até o presente ainda não foi apresentado nenhum estudo no qual esteja descrita a expressão da molécula CD6 nos linfócitos do infiltrado inflamatório da pele na

psoriase, nem a possível associação desta molécula com o desenvolvimento da doença, e além disso ainda não foi avaliado o uso terapêutico de um AcM anti-CD6 nesta doença.

5 Divulgação da Invenção

A novidade da presente invenção consiste em fornecer composições farmacêuticas tópicas e sistêmicas que contêm um anticorpo monoclonal anti-CD6, a obtenção de um anticorpo monoclonal humanizado anti-CD6 e a aplicação 10 terapêutica das composições farmacêuticas em pacientes com psoriase vulgar, utilizando diferentes vias de administração e em diferentes formas clínicas da doença.

Descrição Detalhada da Invenção

Purificação do anticorpo monoclonal murino

15 O anticorpo monoclonal (AcM) anti-CD6 pode ser purificado a partir de líquido ascítico por Proteína A Sepharose, diluído com igual volume de tampão glicina 1,5 M, NaCl 3M pH 8,9; equilibrando-se a matriz com esse mesmo tampão e aplicando-se um volume de ascite igual ao de 20 tampão deve-se eluir a velocidade de fluxo de 50 ml/h. A coluna é lavada por uma noite até a linha base zero, com o mesmo tampão de aplicação.

Em seguida a coluna é lavada com tampão ácido cítrico 0,1M pH 6 para eliminar as IgG1, até que a linha 25 base atinja zero, a uma velocidade de fluxo de 50 ml/h (entre 2 - 5 volumes de coluna, 2 horas aproximadamente). O tampão ácido cítrico 0,1 M, pH 5, é aplicado para eluir as IgG2a (ior t1).

Humanização do anticorpo monoclonal murino

A partir dos AcMs anti-CD6 podem ser construídas, por métodos de engenharia genética, variantes como anticorpos quiméricos e humanizados a partir das regiões variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo murino (Takashi, N. et al. (1982) Cell 29: 718; Hieter, P. A. et al. (1980) Cell 29: 718)

Descrição do método de humanização do anticorpo monoclonal murino ior t1

A partir do hibridoma parental murino secretor do anticorpo monoclonal ior t1 foi obtido um subclone denominado iot t1A que reconhece o mesmo epítopo na molécula CD6.

O ior t1A foi modificado para obter um anticorpo monoclonal menos imunogênico pelo método descrito no pedido de patente européia Nº 0699755, segundo o qual se reduz simultaneamente a imunogenicidade do anticorpo murino original e ao mesmo tempo se preserva suas propriedades de união ao ligador. Como a antigenicidade de uma proteína depende da presença de epítopos T nos mesmos, a imunogenicidade de um anticorpo xenogênico ou alogênico poderia ser reduzida substituindo-se os resíduos incluídos em suas seqüências antigênicas T pelos mesmos encontrados em outras espécies, neste caso em imunoglobulinas humanas. Certamente, a substituição dos referidos resíduos não inclui aminoácidos da chamada zona de "Vernier" nem aqueles incluídos nas estruturas canônicas. Estas substituições não podem afetar os determinantes estrutu-

rais ou as zonas de contato entre os FRs e os CDRs, de tal modo que fica garantida a afinidade na união ao antígeno.

Análise de homologia das regiões variáveis

5 Neste procedimento faz-se uso das seqüências disponíveis de domínios variáveis de anticorpos humanos compilados por Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", quinta edição, Bethesda, Maryland, National Inst. of Health, 1994.

10 Na primeira etapa o domínio variável das cadeias leves e pesadas do ior t1A murino é comparado com os domínios variáveis correspondentes das seqüências humanas. As seqüências de aminoácidos dos domínios variáveis das imunoglobulinas murinas são comparadas com as seqüências 15 de regiões variáveis de imunoglobulinas humanas relatadas, para identificar a imunoglobulina humana que possui maior homologia com a molécula murina submetida à análise.

As bases de seqüências humanas utilizadas foram 20 as relatadas em GeneBank (nov. 1990) e EMBL (nov. 1990). O programa usado para determinar a homologia entre seqüências é o PC-DOS HIBIO PROSIS 06-00, Hitachi.

De acordo com este programa as seqüências são comparadas e identificados os resíduos que são diferentes 25 em cada uma das posições dentro das estruturas ("frameworks") (Kabat E. (1991) Sequences of proteins of immunological interest, quinta edição, National Institute of Health), entre a seqüência humana de maior homologia e

a seqüênci a murina submetida à análise.

Previsão de epítopos T

Na segunda etapa, as duas seqüências de regiões variáveis homólogas (de rato e humana) são analisadas 5 para prever as seqüências antigênicas T.

As seqüências dos domínios variáveis das imuno-globulinas murinas são analisadas com o programa AMPHI (Berzofsky et al. (1987) The Journal of Immunology 138: 2213), o qual permite a previsão de hélice anfipática, à 10 qual foi relacionada a imunogenicidade T.

Análise para redução de imunogenicidade

Depois de identificar na seqüência murina os possíveis epítopos T e identificar os resíduos responsáveis pelas estruturas canônicas, na molécula murina os 15 resíduos que são diferentes entre as duas espécies são substituídos pelos que se encontram na mesma posição na imunoglobulina humana de maior homologia, e estas substituições são realizadas somente naqueles segmentos que os algoritmos prevêem que poderiam ser um epítopo T e somente 20 na região dos Frs.

Finalmente, as substituições dos resíduos intercalados nas estruturas canônicas ou na chamada zona "Vernier" não são incluídas pois podem afetar a estrutura tridimensional do anticorpo e portanto afetar sua união 25 ao antígeno. Informações adicionais sobre a influência das substituições que são feitas na estrutura terciária podem ser obtidas por modelagem molecular das regiões variáveis.

Método para construir e expressar o anticorpo modificado

Os procedimentos a seguir são usados para preparar seqüências de ADN recombinantes, onde os aminoácidos de uma espécie são substituídos por aminoácidos de outras espécies, estas modificações são realizadas nas duas cadeias da região variável de uma imunoglobulina de rato. Uma vez realizadas as mutações, estas são combinadas com uma região constante de uma imunoglobulina humana e são introduzidas em um vetor apropriado para expressar este anticorpo menos imunogênico em células superiores.

a) Mutagênese na região variável das duas cadeias de um anticorpo. Assim as alterações necessárias são introduzidas pelo método de mutagênese por sobreposições de PCR. (Kamman et al., Nucleic Acids Res. 17:5404 (1989)).

b) Preparação de um vetor de expressão que contenha uma região constante humana e uma região variável murina que, uma vez transfetado, as células resultantes secretam a imunoglobulina modificada com a afinidade e especificidade desejadas,

c) Co-transfecção de cadeias leves e pesadas em vetores de expressão apropriados em diferentes linhagens de células.

Depois de duas semanas, os sobrenadantes resultantes da transfecção em placas de 96 compartimentos são analisados por ELISA de detecção de imunoglobulinas humanas. As amostras que produzirem imunoglobulinas humanas serão testadas por um método capaz de detectar a união

deste anticorpo a seu antígeno.

Formulações para realizar estudos com fins de diagnósticos "in vitro" e "in vivo"

Os AcM anti-CD6 podem ser utilizados com fins de
5 diagnósticos "in vitro" e "in vivo" nas diferentes formas
clínicas da psoriase, para o acompanhamento evolutivo dos
pacientes depois de se aplicar procedimentos terapêuticos
locais ou sistêmicos, assim como a previsão de recaídas.

Estes AcM purificados e dissolvidos em solução
10 tampão (pH 7,0 +/- 0,5) que contenha azida sódica (0,01 -
0,2%) e albumina (0,05 - 0,2%) podem ser utilizados para
quantificar os linfócitos T CD6+ e/ou a expressão desta
molécula na superfície das células linfóides em fluidos
biológicos (por exemplo sangue, líquido cefalorraquidiano,
15 líquido sinovial) incubando entre 50 e 200 ml da
amostra com quantidades entre 10 e 30 ml de AcM a concen-
trações entre 0,1 - 3 mg/ml, entre 20 e 30 min a 4°C.

Em seguida, deve-se lavar com solução tampão e
incubar com imunoglobulinas de outra espécie animal con-
20 jugada com substâncias fluorescentes (por exemplo fluo-
resceína, ficoeritrina). Os AcM anti-CD6 podem ser conju-
gados diretamente com substâncias fluorescentes por dife-
rentes métodos (Coligan, J, E. et al. (ed.) Current Pro-
tocols in Immunology, National Institutes of Health. Vol.
25 I:5.3.2. Wiley Interscience) e ser utilizados com finali-
dades similares às descritas, a concentrações entre 5 e
30 mg/ml.

Avaliação imunohistoquímica de lesões de pacientes com psoriase

O estudo imunohistoquímico de lesões cutâneas ou de outros tecidos afetados (por exemplo articulações) de 5 pacientes com psoriase vulgar pode ser realizado sobre ciosseções de tecido (por exemplo pele) fixadas ou não em acetona fria, incubando o AcM anti-CD6 dissolvido entre 3 e 10 mg/ml de solução tampão (pH 7,0 +/- 0,5) que contenha azida sódica (0,05 - 0,2%) e albumina (0,05 - 10 0,2%) durante 30 min. Em seguida as amostras são incubadas com conjugado antiimunoglobulinas murinas Biotilinado e Complexo Biotina-Avidina-Peroxidase (por exemplo de carneiro [Dako]) durante 30 min à temperatura ambiente; finalmente revela-se com o substrato 3-amino-9-etil-15 carbazol [Sigma] (Hsu, S. M. et al. (1981) J. Histochem. Cytochem. 29: 577). As biópsias devem ser analisadas por 2 especialistas e a avaliação do CD6 é ajustada a uma escala de pontos < 10% (\pm), 10 - 25% (+), 25 - 50% (++) , 50 - 90% (+++), 90 - 100% (+++).

20 Podem ser utilizados diferentes AcM dirigidos contra CD de linfócitos T, anti CD3 (ior t3), anti CD4 (ior t4), anti CD8 (ior t8) e um anti CD45 (ior L3), além de um AcM anti-Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (ior egf/r3) como marcador de ativação de ceratinócitos 25 (Mozzanica, N. et al. (1994) Acta Derm. Venereol. Suppl. Stockh. 186: 171), que permita avaliar detalhadamente as características do infiltrado inflamatório das lesões durante o tratamento da doença.

Acompanhamento imunohistoquímico de lesões de pacientes tratados

Em pacientes tratados com anticorpos monoclonais anti-CD6 pode ser realizada biópsia das lesões antes do 5 início do tratamento, durante o tratamento e depois de concluído o mesmo, em área limitada à biópsia inicial para avaliar a eficácia terapêutica das composições de uso tópico ou sistêmico. A escala de classificação da resposta ao tratamento pode ser qualitativa em por cento 10 e é estabelecida segundo o índice de marcação de células CD6+ sobre o total de células CD45+, avaliado em cada biópsia.

$$\text{Índice de células CD6+} = \frac{\text{número de células CD6+} \times 100}{\text{número de células CD45+}}$$

15 Pode-se estabelecer, além disso, os índices de marcação de células CD3+, CD4+ e CD8+ sobre o total de células CD45+ e o índice de marcação de células CD4+ e CD8+ sobre o total de células CD6+.

$$\text{Índice de células CD3+} = \frac{\text{número de células CD3+} \times 100}{\text{número de células CD45+}}$$

$$\text{Índice de células CD4+} = \frac{\text{número de células CD4+} \times 100}{\text{número de células CD45+}}$$

$$\text{Índice de células CD8+} = \frac{\text{número de células CD8+} \times 100}{\text{número de células CD45+}}$$

25 $\text{Índice de células CD4+} = \frac{\text{número de células CD4+} \times 100}{\text{número de células CD6+}}$

$$\text{Índice de células CD8+} = \frac{\text{número de células CD8+} \times 100}{\text{número de células CD6+}}$$

Acompanhamento imunogamagráfico de pacientes tratados

Outra forma para avaliar o efeito da terapêutica com o AcM anti-CD6 pode ser o estudo imunogamagráfico no paciente da expressão e distribuição das células CD6+ durante o tratamento, utilizando entre 1 e 5 mg do mesmo AcM conjugado com isótopos radioativos como o tecnécio 99, utilizando o método de conjugação como o descrito por Mather, S. J. et al. (1990) J. Nucl. Med. 31(5): 692.

Obtenção de formulações terapêuticas para uso tópico e sistêmico

Com fins terapêuticos os AcM anti-CD6 podem ser utilizados nas diferentes formas clínicas da psoríase, com formulações tanto para uso tópico como sistêmico, em dose única ou doses múltiplas, com um ou vários ciclos de tratamento de acordo com a forma clínica e a gravidade da doença.

As formulações terapêuticas de uso tópico com AcM anti-CD6 podem ser compostas por sistemas semi-sólidos em uma ou duas fases, principalmente com formulações hidrófilas que permitam a incorporação do AcM dissolvido em solução tampão estéril (pH 7,0 +/- 0,5) em uma dose entre 0,1 mg e 5 mg por cada grama de produto. Podem ser formulados géis, geléias, ungüentos, loções ou cremes com matriz líquida (por exemplo água) formulada com gelatina, carboximetil celulose ou substâncias similares e bases que contenham glicerina, gluconato de cálcio; além disso as composições podem incluir preservativos (por exemplo p-hidroxibenzoato metílico) para evitar contami-

nação, o pH deve ser fisiológico para não afetar as características do AcM. Estas composições terapêuticas devem permitir a liberação e penetrabilidade do AcM na pele.

5 O tratamento típico deve ser aplicado entre uma e três vezes ao dia, sobre as lesões cobertas ou não e pode ser combinado com o uso sistêmico (principalmente endovenoso) do mesmo AcM com doses entre 0,1 e 1 mg/kg de peso do paciente, e deve ser diluído em solução fisiológica para uso endovenoso e administrado lentamente. O tratamento endovenoso pode ser aplicado independentemente da via tópica de administração.
10

Acompanhamento clínico dos pacientes tratados

Como critério principal de avaliação da eficácia terapêutica pode-se utilizar a evolução clínica das lesões.

As variáveis principais de resposta utilizadas para medir os efeitos do tratamento podem ser a melhora das características clínicas das lesões (infiltração, escamas, eritema) e a redução da área das lesões.
20

Pode-se estabelecer o grau de severidade dos indícios da doença (infiltração, escamas, eritema) entre os valores 0 - 1 - 2

- 0 - sem indício
- 25 1 - presença escassa
- 2 - presença intensa

Deve-se considerar ainda a extensão das placas tratadas medindo-se 2 de seus diâmetros e calcular a área

da lesão com o produto dos raios (em cm) por p (3,14), o tamanho da placa no tempo 0 representa 100% e nos tempos de avaliações sucessivas se estabelece o percentual do tamanho da placa pela regra de 3.

5 É obtido um TÍTULO DE SEVERIDADE DA PSORÍASE (TSP) similar ao PASI (área psoriática e índice de severidade (psoriasis area and severity index)) (Fredriksson, T. et al. (1978) Dermatologica 157: 238), com a fórmula: (infiltração (0-2) + escamas (0-2) + eritema (0-2)/6) x %
10 de área afetada

A resposta ao tratamento é descrita de acordo com as alterações no TSP ao completar os tempos de avaliação designados, sendo estabelecidas as seguintes categorias (Perkins, W. et al. (1993) Br. J. Dermatol. 129:
15 584):

clareamento (> 90% de melhora no TSP)

respondente (> 50% de melhora no TSP)

não-respondente (< 50% de melhora no TSP ou piora do TSP)

piora (> 50% de aumento no TSP)

20 Pode-se considerar os tempos de avaliação da resposta até as 12 semanas a contar do início da aplicação do tratamento (pré-tratamento, semanas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12).

Exemplos de realização

25 Exemplo 1. SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO VARIÁVEL DO ANTICORPO MONOCLONAL MURINO ior t1A

O RNA foi extraído a partir de 10^6 células do hibridoma ior t1A. O mesmo foi preparado como descrito

por Faloro e colaboradores (Faloro, et al. (1989) Method in Enzymology 65: 718).

A reação de síntese de cADN consiste em adicionar 5 µg de RNA, 250 µM de cada um de dNTP, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 75 mM KCl, 10 mM DDT, 3 mM MgCl₂, 25 pmoles do oligo CG2A FOR (5'GGAAGCTTAGACCGATGGGGCTGTTGTTTG 3') para a região variável de cadeia pesada ou 25 pmoles de CK2 FOR (5'GGAAGCTTGAAGATGGATAACAGTTGGTGCAGC 3') e 15 unidades de inibidor de RNAsa para um volume total de 15 µl, aquecidos a 70°C por 10 minutos e lentamente resfriados até 37°C. Adiciona-se então ao mesmo 100 unidades de transcriptase invertida (BRL) e incuba-se a 37°C por 1 hora.

Os cADNs de VH e VK foram então ampliados por PCR, como descrito por Orlandi e colaboradores (Orlandi et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833). Para a ampliação de VH, faz-se uma mistura reacional à qual são adicionados a 5 µl de cADN:

25 pmoles do oligo CG2A FOR e 25 pmoles do oligo VH1BACK (5'AGGT(G/C)(A/C)A(A/G)CTGCAG(G/C)AGTC(A/T)GG3').

Para a ampliação de VK, a mistura reacional consiste de 5 µl de cADN, 25 pmoles de CK2 FOR e VK10BACK (5'TTGAATTCCAGTGATGTTTGATGACCCA3').

A estas misturas são adicionados 2,5 mM de cada um de dNTP, 5 µl de tampão 10X da enzima Thermolase e uma unidade desta enzima, em um volume final de 50 µl. A mistura reacional foi submetida a 25 ciclos de desnaturali-

zação, hibridização e extensão a 94°C, 55°C e 72°C, respectivamente, com uma incubação final de 5 min a 72°C. Géis a 2% de agarose, tingidos com brometo de etídio, foram usados para visualizar os fragmentos produzidos por 5 PCR. Os referidos fragmentos foram purificados com Prep A gene (kit da Bio Rad) e clonados em M13. Os clones foram sequenciados usando-se o método dos dideoxinucleotídeos com enzima T7 ADN polimerase de Pharmacia (ver figuras 1 e 2).

10 Exemplo 2. MODIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA DAS REGIÕES VARIÁVEIS DO ANTICORPO MONOCLONAL MURINO ior t1A PARA OBTER UMA IMUNOGLOBULINA MENOS IMUNOGÊNICA POR HUMANIZAÇÃO DOS EPÍ-TOPOS T POTENCIAIS

Parte-se do conhecimento da seqüência da região variável da cadeia pesada do anticorpo monoclonal ior t1A. Esta seqüência foi analisada com o programa AMPHI, o qual determinou as regiões de 11 aminoácidos com estrutura de hélice anfipática e portanto as regiões candidatas a se unirem às moléculas do MHC II.

20 Na região variável da cadeia pesada do anticorpo ior t1A aparecerão 3 blocos fundamentais:

- 1.FR 1 entre os aminoácidos 2-21.
- 2.CDR1 e FR2 entre os aminoácidos 29-43.
- 3.CDR3 e FR4 entre os aminoácidos 95-111.

25 A numeração dos aminoácidos corresponde àquela proposta por Kabat com base nos aminoácidos não-variantes. Nas figuras 1 e 2 estão representados os epítópos T possíveis. A figura 1 mostra as seqüências cor-

respondentes à cadeia pesada.

A seqüência murina é comparada com as seqüências de proteínas humanas apresentadas nos bancos de dados GenBank e EMBL, de onde é extraída a seqüência da região variável de uma imunoglobulina humana que apresenta maior homologia, pertencente ao subgrupo III de Kabat. Em seguida procede-se à determinação daqueles aminoácidos da imunoglobulina murina que diferem daqueles que se encontram na mesma posição na seqüência humana. As duas regiões variáveis de cadeia pesada, a humana e a murina, são comparadas e são escolhidos os aminoácidos nos Frs que não estão intercalados na zona de "Vernier" ou nas estruturas canônicas e que poderão ser substituídos. As posições 13 e 19 não se modificam porque o aminoácido Lys se encontra nestas posições em outras imunoglobulinas humanas pertencentes ao mesmo subgrupo.

Para a cadeia pesada foram propostas 4 alterações:

THR da posição 40 por ALA.

GLU da posição 42 por GLY.

THR da posição 108 por LEU.

LEU da posição 109 por VAL.

Na figura 2 está mostrada a análise anterior aplicada à cadeia leve do ior t1A, dando como resultado um grupo de segmentos superpostos que prevêem uma zona antigênica do aminoácido 2 ao 69.

Depois da análise são propostas 7 substituições nos Frs 1 e 2.

- LYS na posição 3 por GLN.
- MET na posição 11 por LEU.
- TYR na posição 12 por SER.
- LEU na posição 15 por VAL.
- 5 - GLU na posição 17 por ASP.
- TRP na posição 41 por GLY.
- SER na posição 43 por ALA.

Exemplo 3. CONSTRUÇÃO DO MUTANTE POR HUMANIZAÇÃO DE EPÍ-
TOPOS T NA REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA PESADA DO ANTICORPO
10 MONOCLONAL ior t1A

As alterações nos aminoácidos da região variável de cadeia pesada para construir o mutante por humanização de epítopos T foram construídas por mutagênese sobrepondo PCRs (Kamman, M. et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. 15 USA, 86, 4220).

Em resumo, duas ampliações por PCR: A mistura reacional foi: 0,5 µl de sobrenadante de VH de cadeia simples clonado em M13, 25 pmoles de oligos mutagênicos 1 ou 2, 25 pmoles de oligo mutagênico 3 ou 4 (ver abaixo as seqüências dos oligos). A estas misturas foram adicionados 2,5 mM de cada um de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 5 µl do tampão 10X da Vent ADN polimerase (NEB) e uma unidade da Vent ADN polimerase (NEB) em um volume final de 50 µl. As amostras foram submetidas a 12 - 15 ciclos de PCR (94°C, 25 30 seg; 50°C, 30 seg e 75°C, 1 min) com uma incubação final de 75°C, 5 min. Os produtos de ambas as PCRs estão unidos em uma segunda PCR usando somente os oligos de

fora (3 e 4). O VH mutante ampliado foi purificado pelo kit de purificação Prep.A gene (Bio Rad).

Para as alterações nas posições 40 e 42 os oligos usados foram os seguintes:

5 Oligo 1:

5' TGGGTTGCCAGGCTCCGGGAAGAGGCTGGAG3'

Oligo 3:

5' GTAAAACGACGGCCAGT3'

Estes oligos foram combinados em uma única PCR.

10 Oligo 2:

5' CTCCAGCCTCTCCCCGGAGCCTGGCGAACCCA3'

Oligo 4:

5' AGCGGATAACAATTTCACACAGGA3'.

Estes oligos foram combinados em uma única PCR.

15 Os produtos das duas PCRs são utilizados em uma única PCR usando os oligos 3 e 4.

Para as alterações nas posições 108 e 109, os oligos construídos foram:

Oligo 1:

20 5' GGCCAAGGCACCCCTTGTCAACCGTCTCC3'.

Oligo 3:

5' GTAAAACGACGGCCAGT3'.

Estes oligos foram combinados em uma única PCR.

Oligo 2:

25 5' GGTGACTCTGTCTCCCACCGATGCAGACAGGGAGGATGGAGACTGGGTCACTCTGG
ATGTCACA 3'

Oligo 4: 5' ACTGGCCGTCGTTTAC 3'

Estes oligos foram combinados em uma única PCR.

Os produtos das duas PCRs são utilizados em uma única PCR usando os oligos 3 e 4.

Para a cadeia leve, as alterações no FR1 nos resíduos 3, 11, 12, 15 e 17, os oligos construídos foram os 5 seguintes:

Oligo 1: 5'CAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGACCCTG 3'

Oligo 3: 5'GTAAAACGACGGCCAT3'

Estes oligos são combinados em uma única PCR.

Oligo 2: 5'CAGGGTCTTAGGAGCTTCCTGGTTCTG 3'

10 Oligo 4: 5'ACTGGCCGTCGTTTAC3'.

Estes oligos são combinados em uma única PCR.

Os produtos das duas PCRs são combinados em uma única PCR usando os oligos 3 e 4.

Para as alterações propostas nos resíduos 41 e 15 43 do FR2, os oligos foram:

Oligo 1: 5'CAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGACCCTG3'

Oligo 3: 5'GTAAAACGACGGCCAT3'.

Estes oligos são combinados em uma única PCR.

Oligo 2: 5'CAGGGTCTTAGGAGCTTCCTGGTTCTG 3'

20 Oligo 4: 5'ACTGGCCGTCGTTTAC3'.

Estes oligos são combinados em uma única PCR.

Os produtos das duas PCRs são combinados em uma única PCR usando os oligos 3 e 4.

Exemplo 4

25 Obtenção de uma formulação farmacêutica para uso tópico em lesões cutâneas de pacientes com psoríase vulgar

O AcM murino ior t1 foi purificado e dissolvido em solução tampão estéril (pH 7,0 +/- 0,5).

Ingredientes	Quantidade	Qualidade
AcM ior t1	50 mg	*
fosfato de sódio monobásico	4,50 mg	reativo USPXXII
fosfato de sódio dibásico	18 mg	reativo USPXXII
cloreto de sódio	86 mg	reativo USPXXII
Polisorbato 80	1,852 µl	USPXXII
água para injeção qsp	10 ml	USPXXII

* conforme especificações de qualidade do fabricante.

A solução que contém o AcM foi incorporada a uma geléia base com a composição:

5 Carboximetil celulose sódica

(alta viscosidade) A/V 3,00 g

propileno glicol 10,00 g

metilparabeno 0,180 g

propilparabeno 0,020 g

10 trietanolamina 0,045 g

água destilada qsp completar. 100,00 g

A geléia terapêutica foi elaborada com solução tampão com composição similar à descrita para o AcM (pH 7,0 +/- 0,5).

15 Exemplo 5

Estudo histológico de lesões cutâneas de pacientes com psoríase vulgar

O estudo imunohistoquímico de lesões cutâneas de pacientes com psoríase vulgar foi realizado em criosse-

ções de pele, o AcM ior t1 foi utilizado paralelamente com diferentes AcM dirigidos contra CD de linfócitos T ior t3 (anti CD3), ior t4 (anti CD4), ior t8 (anti CD8), ior L3 (anti CD45) e Dako CD6 (anti-CD6) como controle, e 5 ainda o ior egf/r3 (anti-receptor do fator de crescimento epidérmico). Em seguida as amostras foram incubadas com conjugado de carneiro anti imunoglobulinas murinas biotinilado e complexo biotina-avidina-peroxidase [Dako], e finalmente foram reveladas com 3-amino-9-etilcarbazol 10 [Sigma]. As biópsias foram analisadas por 2 especialistas e a avaliação do CD6 foi associada a uma escala de pontos:

<10% (\pm) , 10 - 25% (+) , 25 - 50% (++) , 50 - 90%
15 (+++) , 90 - 100% (++++) .

Nos pacientes tratados a biópsia das lesões foi feita antes do início do tratamento e ao terminar a terceira semana de tratamento, na área confinada à biópsia inicial. A escala de classificação da resposta ao tratamento foi qualitativa em percentagem e foi estabelecida 20 de acordo com o índice de marcação de células CD6+ sobre o total de células CD45+, avaliado em cada biópsia. Foi ainda determinada a percentagem de expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico nas diferentes camadas da pele, bem como as modificações das características 25 histológicas típicas da doença.

- Os linfócitos CD3+ representam aproximadamente 100% das células CD45+.

- Foi verificado que no infiltrado inflamatório característico da psoríase vulgar existe expressão entre 60 - 90% de células com fenótipo linfóide T CD6+.
- Das células marcadas com anticorpo monoclonal Dako CD6 5 apenas entre 30 - 50% foram marcadas com o anticorpo monoclonal ior t1.
- A expressão em ceratinócitos do receptor de FCE foi elevada com padrão reticulado.

Resulta significativo o predomínio de expressão 10 da molécula CD6+ nos linfócitos T do infiltrado inflamatório da psoríase vulgar, por ser uma molécula característica de linfócitos T ativados, isto nos leva a pensar que esta pode constituir uma molécula de adesão leucocitária nos linfócitos T inicialmente ativados na pele pela 15 penetração de antígenos exógenos ou próprios modificados, necessária para a interação com determinantes celulares específicos da pele ativada durante a resposta aos referidos antígenos. A diferença de reconhecimento observada entre os anticorpos monoclonais anti-CD6 avaliados sus- 20 tenta a hipótese da diferença de epítopo reconhecido pelo ior t1.

Exemplo 6

Resposta clínica de pacientes com psoríase vulgar à terapêutica tópica com AcM ior t1

25 Foi realizado um ensaio clínico em pacientes com psoríase vulgar diagnosticada, em recidiva, com lesões características desta doença. O estudo foi estruturado em dois grupos de pacientes definidos pela geléia que rece-

bem como tratamento tópico (AcM ior t1 ou veículo) e foram incluídos 14 pacientes por grupo. Foi utilizada uma formulação terapêutica tópica formada por uma geléia base ou veículo (carbóximetil celulose sódica A/V, propilenoglicol, metilparabeno, propilparabeno, trietanolamina) sobre a qual foi incorporado o AcM. O tratamento foi aplicado 2 vezes ao dia sem oclusão das lesões tratadas, durante 21 dias.

Todos os pacientes tratados com o AcM ior t1 10 veram as lesões psoriáticas clareadas em placas (figura 4). Este resultado corresponde ao observado na biópsia pós-tratamento apenas 21 dias depois de iniciada a aplicação do AcM, onde foi verificada diminuição do infiltrado linfocitário T, diminuição da expressão do receptor do EGF em ceratinócitos e regressão dos indícios histológicos característicos da doença.

Exemplo 7

Relação da resposta clínica com a dose de anticorpo monoclonal murino ior t1 aplicado topicalmente nos pacientes com psoriase vulgar

Foi realizado um ensaio clínico em 19 pacientes com psoriase vulgar diagnosticada em recidiva, com lesões características desta doença. O estudo foi estruturado em três grupos de pacientes definidos pela concentração de anticorpo monoclonal ior t1A contida na formulação terapêutica que receberam como tratamento tópico (0,3 mg, 1 mg ou 3 mg de AcM ior t1A) e foram incluídos 6, 7 e 6 pacientes respectivamente por grupo. Foi utilizada uma for-

mulação terapêutica tópica formada por uma geléia base ou veículo (carbóximetil celulose sódica A/V, propileno glicol, metilparabeno, propilparabeno, trietanolamina) sobre a qual foi incorporado o AcM. O tratamento foi aplicado 25 vezes ao dia sem oclusão das lesões tratadas, durante 21 dias.

A evolução clínica dos pacientes foi avaliada utilizando o PASI (Área Psoriática e Índice de Severidade (Psoriatic Area and Severity Index)) e simultaneamente o soro destes pacientes foi analisado quanto ao aparecimento da resposta de anticorpos humanos contra as imunoglobulinas humanas (anticorpo antacamundongo humano - HAMA). A melhor resposta clínica foi observada no grupo de pacientes tratados com a dose mais baixa de AcM ior t1 (0,3 mg) que correspondeu ao grupo de maior freqüência de aparecimento e os maiores títulos de resposta HAMA. Foi ainda avaliada a presença de anticorpos antiidiotípicos (anti-AcM ior t1) pelo método ELISA (Teste Imunossorvente de enzima ligada (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)) e por FACS (classificador de célula ativadora de fluorescência (Fluorescent Activating Cell Sorter)) e foi observada maior freqüência de aparecimento e maior título de resposta de anticorpos antiidiotípicos contra o ior t1 no mesmo grupo de pacientes.

25 Exemplo 8

Resposta clínica de um paciente com forma severa de psoriasis generalizada à terapêutica endovenosa com o AcM ior t1

Uma paciente do sexo feminino de 56 anos de idade com antecedentes de apresentar psoriase com artropatia psoriática diagnosticada há aproximadamente 17 anos, nos últimos 5 anos com crises freqüentes e intensas por causa das quais foi internada várias vezes. Começa com gomos da doença, com lesões eritemato-escamosas generalizadas, dores ósseas e musculares, debilitação ("toma") do estado geral, febrícula e edemas generalizados, este quadro se mantém e 21 dias depois aparecem nas dobras submamárias, axilares e no colo lesões fissuradas com ulcerações com secreção serosa e malcheirosa, acompanhado de febre. Pela evolução tórpida da doença, a não tolerância a nenhum tratamento tópico incluindo cremes esteroidais, decide-se administrar tratamento com metotrexate (dose total 15 mg) 3 ciclos, sem aparecer resposta clínica.

- Dose única de AcM ior t1 a 0,6 mg/kg de peso por via endovenosa lenta, diluído em 200 ml de solução salina a 0,9%.
- Simultaneamente foi administrada, durante 2 dias, em todas as lesões, duas vezes ao dia, geléia terapêutica que contém o AcM ior t1 à concentração de 3 mg de AcM / g de geléia.

A partir do dia 6 de realização do tratamento a paciente começa a melhorar seu estado geral e quadro dermatológico. Ela foi avaliada aos 21 dias de tratamento e apresentava aproximadamente 60% da superfície corporal sem lesões e o resto da pele com melhora dos indícios clínicos da doença; a paciente menciona melhora da sinto-

matologia articular; apresenta bom estado geral, sinais vitais normais e exames de rotina de laboratório clínico sem alterações.

Trinta dias depois a paciente continua com regressão completa da sintomatologia da doença.

Breve Descrição dos Desenhos

Figuras 1 e 2 - Análise para a modificação por humanização de epítopos T das regiões variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo monoclonal murino ior t1A.

Figura 1: Seqüência da região variável da cadeia pesada do AcM murino ior t1A.

Figura 2: Seqüência da região variável da cadeia leve do AcM murino ior t1A.

A: Seqüência da região variável da cadeia pesada ou leve do AcM murino ior t1A.

B: Seqüência da região variável da Ig humana que mais se parece com o ior t1A.

C: Seqüência modificada do ior t1A, por humanização de epítopos T.

Resíduos de aminoácidos sublinhados: aminoácidos intercalados na estrutura terciária.

Letras em negrito: regiões determinantes de complementariedade (CDRs).

Resíduos de aminoácidos envolvidos em um quadro: alterações propostas.

A descrição é similar para cadeias pesadas e leves.

Figura 3 - Apresenta o resultado da expressão do antígeno CD6 em linfócitos do infiltrado inflamatório característicos das lesões cutâneas de pacientes com psoríase vulgar. Esta avaliação foi realizada em biópsias por 5 congelamento de pele afetada com lesões localizadas em membros superiores e/ou inferiores e/ou tórax-abdômen em forma de placas. A avaliação histológica foi realizada antes do tratamento por técnicas de imunohistoquímica.

Figura 4 - A avaliação da eficácia terapêutica 10 do AcM anti CD6 utilizada no tratamento da psoríase foi realizada levando-se em conta as variáveis infiltração, escamas, eritema e tamanho da área das lesões; foi estabelecido um grau de severidade entre os valores 0 - 1 - 2; foi ainda considerada a extensão das placas tratadas 15 medindo-se 2 de seus diâmetros. Foi obtido um TÍTULO DE SEVERIDADE DA PSORÍASE (TSP) similar ao PASI ("psoriasis area and severity index") e a resposta ao tratamento é classificada de acordo com as alterações no TSP ao terminar os tempos de avaliação designados, estabelecendo-se 20 as seguintes categorias: clareamento, respondente, não respondente e piora.

Figura 5 - A resposta clínica dos pacientes tratados topicalmente com o anticorpo monoclonal ior t1A contido na formulação terapêutica 25 a diferentes doses (0,3 mg, 1 mg ou 3 mg de AcM ior t1A) avaliada por PASI foi relacionada com o aparecimento da resposta de anticorpos humanos contra as imunoglobulinas murinas (anticorpo an-

ticamundongo humano - HAMA). A melhor resposta clínica foi observada no grupo de pacientes tratados com a dose mais baixa do AcM ior t1 (0,3 mg), o que correspondeu ao grupo de maior freqüência de aparecimento e os maiores 5 títulos de resposta HAMA.

Figura 6 - Um tratamento com o anticorpo monoclonal ior t1 por via endovenosa foi aplicado a uma paciente de 56 anos de idade com antecedentes de apresentar psoriase com artropatia psoriática diagnosticada há aproximadamente 17 anos, agora na forma severa de psoriase generalizada caracterizada por lesões eritemato-escamosas generalizadas, dores ósseas e musculares, debilidade ("toma") do estado geral, febrícula e edemas generalizados. Quadro que não melhora com tratamento médico, inclusive metotrexate. Foi aplicado à paciente um tratamento em dose única de AcM ior t1 a 0,6 mg/kg de peso por via endovenosa lenta, diluído em 200 ml de solução salina a 0,9%, simultaneamente foi administrada, durante 2 dias, em todas as lesões, duas vezes ao dia, geléia terapêutica 15 que contém o AcM ior t1 à concentração de 3 mg de AcM / g de geléia, para um total de 224 g de geléia terapêutica. As respostas clínica, imunohistoquímica e de laboratório 20 clínica foram avaliadas semanalmente, e estão mostradas fotografias evolutivas das lesões cutâneas (dia anterior 25 ao tratamento e aos 21 dias).

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal que reconhece o CD6 humano e útil no diagnóstico e tratamento da psoriase, caracterizado por ser um anticorpo monoclonal humanizado tendo a região variável de sua cadeia pesada com a seguinte seqüência:

GLU VAL GLN LEU VAL GLU SER GLY GLY GLY LEU VAL
LYS PRO GLY GLY SER LEU LYS LEU SER CYS ALA ALA
SER GLY PHE LYS PHE SER ARG TYR ALA MET SER TRP
10 VAL ARG GLN ALA PRO GLY LYS ARG LEU GLU TRP VAL
ALA THR ILE SER SER GLY GLY SER TYR ILE TYR TYR
PRO ASP SER VAL LYS GLY ARG PHE THR ILE SER ARG
ASP ASN VAL LYS ASN THR LEU TYR LEU GLN MET SER
SER LEU ARG SER GLU ASP THR ALA MET TYR TYR CYS
15 ALA ARG ARG ASP TYR ASP LEU ASP TYR PHE ASP SER
TRP GLY GLN GLY THR LEU VAL THR VAL SER SER
e a região variável de sua cadeia leve com a seguinte seqüência:

ASP ILE GLN MET THR GLN SER PRO SER SER LEU SER
20 ALA SER VAL GLY ASP ARG VAL THR ILE THR CYS LYS
ALA SER ARG ASP ILE ARG SER TYR LEU THR TRP TYR
GLN GLN LYS PRO GLY LYS ALA PRO LYS THR LEU ILE
TYR TYR ALA THR SER LEU ALA ASP GLY VAL PRO SER
ARG PHE SER GLY SER GLY GLN ASP TYR SER
25 LEU THR ILE SER SER LEU GLU SER ASP ASP THR ALA
THR TYR TYR CYS LEU GLN HIS GLY GLU SER PRO PHE
THR PHE GLY SER GLY THR LYS LEU GLU ILE LYS ARG
ALA.

2. Uso de um anticorpo monoclonal humanizado,
30 como definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser para o diagnóstico *in vitro* de psoriase.

3. Composição farmacêutica para o tratamento da psoriase, caracterizada por conter um anticorpo monoclo-

nal, como definido na reivindicação 1, e um veículo farmacologicamente aceitável.

4. Reagente útil para o diagnóstico da psoriase, caracterizado por conter um anticorpo monoclonal, como definido na reivindicação 1, e um veículo.

FIGURA 1:

A	I	1	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL
B	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL	
C	GLU	VAL	GLN	LEU	VAL	GLU	SER	GLY	GLY	GLY	GLY	LEU	VAL	
	13													12
A	LYS	PRO	GLY	GLY	SER	LEU	LYS	LEU	SER	CYS	ALA	ALA		24
B	GLN	PRO	GLY	GLY	SEK	LEU	ARG	LEU	SER	CYS	ALA	ALA		
C	LYS	PRO	GLY	GLY	SER	LEU	LYS	LEU	SER	CYS	ALA	ALA		
	25													36
A	SER	<u>GLY</u>	<u>PHE</u>	<u>LYS</u>	<u>PHE</u>	<u>SEN</u>	<u>ARG</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	<u>MET</u>	<u>SER</u>	<u>TRP</u>		
B	SER	<u>GLY</u>	<u>PHE</u>	<u>THR</u>	<u>PHE</u>	<u>SER</u>	<u>ARG</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	<u>MET</u>	<u>SER</u>	<u>TRP</u>		
C	SER	<u>GLY</u>	<u>PHE</u>	<u>LYS</u>	<u>PHE</u>	<u>SER</u>	<u>ARG</u>	<u>Tyr</u>	<u>Ala</u>	<u>MET</u>	<u>SER</u>	<u>TRP</u>		
	37													48
A	VAL	ARG	GLN	THR	PRO	GLU	LYS	ARG	LEU	GLU	TRP	VAL.		
B	VAL	ARG	GLN	ALA	PRO	GLY	LYS	GLY	LEU	GLU	TRP	VAL.		
C	VAL	ARG	GLN	ALA	PRO	GLY	LYS	ARG	LEU	GLU	TRP	VAL.		
	49													59
A	ALA	THR	ILE	SER	SER	GLY	GLY	SER	Tyr	ILE	Tyr	Tyr		
B	SER	THR	ILE	SER	SER	GLY	GLY	SER	Tyr	ILE	Tyr	Tyr		
C	ALA	THR	ILE	SER	SER	GLY	GLY	SER	Tyr	ILE	Tyr	Tyr		
	60													71
A	PRO	ASP	SER	VAL	LYS	GLY	ARG	PHE	THR	ILE	SER	SER		
B	PRO	ASP	SER	VAL	LYS	GLY	ARG	PHE	THR	ILE	SER	SER		
C	PRO	ASP	SER	VAL	LYS	GLY	ARG	PHE	THR	ILE	SER	SER		
	72													82A
A	ASP	ASN	VAL	LYS	ASN	THR	LEU	TYR	LEU	GLN	MET	SER		
B	ASP	ASN	SER	LYS	ASN	THR	LEU	TYR	LEU	GLN	MET	ASN		
C	ASP	ASN	VAL	LYS	ASN	THR	LEU	TYR	LEU	GLN	MET	SER		
	82B													92
A	SER	LEU	ARG	SER	GLU	ASP	THR	ALA	MET	TYR	TYR	CYS		
B	SER	LEU	ARG	ALA	GLU	ASP	THR	ALA	VAL	TYR	TYR	CYS		
C	SER	LEU	ARG	SER	GLU	ASP	THR	ALA	MET	TYR	TYR	CYS		
	93													102
A	ALA	<u>ARG</u>	<u>ARG</u>	<u>ASP</u>	<u>Tyr</u>	<u>ASP</u>	<u>Leu</u>	<u>ASP</u>	<u>Tyr</u>	<u>Phe</u>	<u>ASP</u>	<u>Ser</u>		
B	ALA	<u>LYS</u>												
C	ALA	<u>ARG</u>	<u>ARG</u>	<u>ASP</u>	<u>Tyr</u>	<u>ASP</u>	<u>Leu</u>	<u>ASP</u>	<u>Tyr</u>	<u>Phe</u>	<u>ASP</u>	<u>Ser</u>		
	103													113
A	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	THR	LEU	THR	VAL	SER	SER	SER		
B	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	LEU	VAL	THR	VAL	SER	SER	SER		
C	TRP	GLY	GLN	GLY	THR	LEU	VAL	THR	VAL	SER	SER	SER		

FIGURA 2:

	1	3	11	12
A	ASP	<u>ILE</u>	LYS	<u>MET</u>
B	ASP	<u>ILE</u>	GLN	<u>MET</u>
C	ASP	<u>ILE</u>	GLN	MET
	13	15	17	24
A	ALA	SER	LEU	GLY
B	ALA	SER	VAL	GLY
C	ALA	SER	VAL	GLY
			ASP	
			ARG	VAL
			THR	ILE
			THR	ILE
			THR	THR
			CYS	LYS
	25			36
A	ALA	SER	ARG	ASP
B				
C	ALA	SER	ARG	ASP
			ILE	ARG
			SER	TYR
				LEU
				THR
				<u>TRP</u>
				<u>TYR</u>
	37		41	48
A	GLN	GLN	LYS	PRO
B	GLN	GLN	LYS	PRO
C	GLN	GLN	LYS	PRO
			<u>TRP</u>	LYS
			GLY	LYS
			ALA	ALA
				PRO
				LYS
				THR
				LEU
				ILE
	49			60
A	<u>TYR</u>	TYR	ALA	THR
B	<u>TYR</u>			
C	<u>TYR</u>	TYR	ALA	THR
			SER	LEU
				ALA
				ASP
				GLY
				VAL
				PRO
				SER
	61			72
A	ARG	PHE	SER	<u>GLY</u>
B	ARG	PHE	SER	<u>GLY</u>
C	ARG	PHE	SER	<u>GLY</u>
			SER	<u>GLY</u>
				<u>GLN</u>
				ASP
				<u>TYR</u>
				SER
	73			84
A	LEU	THR	<u>ILE</u>	SER
B	LEU	THR	<u>ILE</u>	SER
C	LEU	THR	<u>ILE</u>	SER
			SER	LEU
				GLU
				SER
				ASP
				ASP
				THR
				<u>PHE</u>
				ALA
	85			96
A	THR	TYR	TYR	CYS
B	THR	TYR	TYR	CYS
C	THR	TYR	TYR	CYS
			LEU	GLN
				HIS
				GLY
				GLU
				SER
				PRO
				<u>PHE</u>
	97			108
A	THR	<u>PHE</u>	GLY	SER
B	THR	<u>PHE</u>	GLY	GLN
C	THR	<u>PHE</u>	GLY	SER
			GLY	GLY
			THR	THR
			LYS	LYS
			LEU	LEU
			GLU	GLU
			ILE	ILE
			LYS	LYS
				ARG
A	ALA			
B	THR			
C	ALA			

FIGURA 3

Paciente	Expresión del CD6	Diagnóstico Histológico
1.IRM	+++	Psoriasis vulgar
2.ZEAP	+++	Psoriasis vulgar
3.DLH	+++	Psoriasis vulgar
4.JMV	+++	Psoriasis vulgar
5.MCGH	+++	Psoriasis vulgar
6.DMMG	+++	Psoriasis vulgar
7.ACP	+++	Psoriasis vulgar
	+++	Psoriasis vulgar
9.MPC	+++	Psoriasis vulgar
10.NRG	+++	Psoriasis vulgar
11.MVMH	+++	Psoriasis vulgar
12.IMVR	+++	Psoriasis vulgar
13.MEGA	+++	Psoriasis vulgar
14.CBT	+++	Psoriasis vulgar

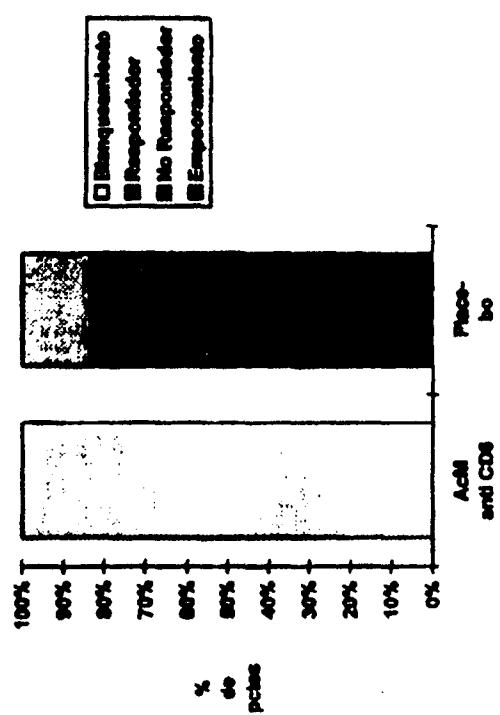


FIGURA 4

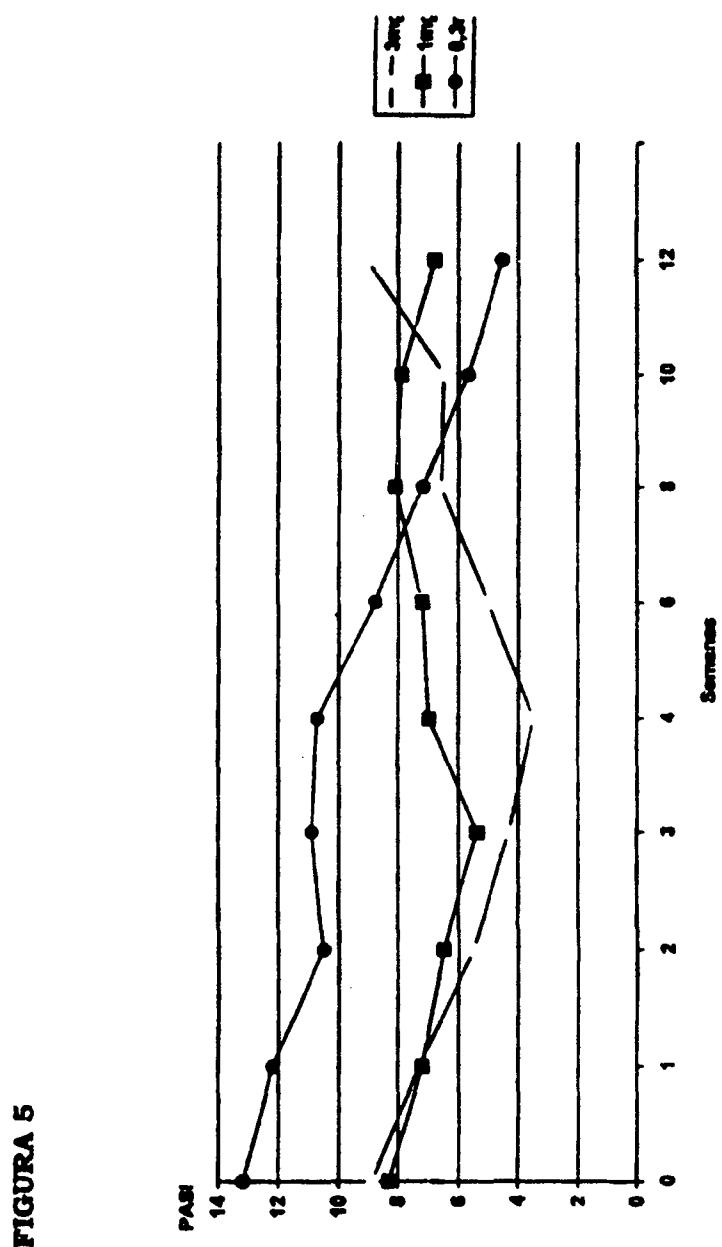
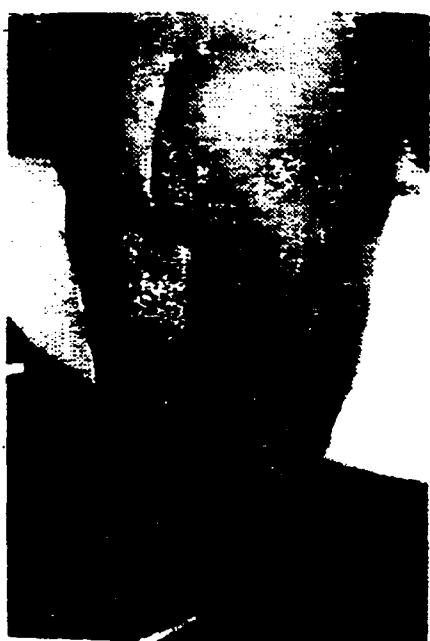


FIGURA 5

FIGURA 6



RESUMO

Patente de Invenção: "**ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CD6 HUMANO, USOS DOS MESMOS PARA O DIAGNÓSTICO IN VITRO DE PSORÍASE, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E REAGENTE CONTENDO O DITO ANTICORPO**".

A presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais que reconhecem o antígeno CD6 humano e são úteis no diagnóstico e tratamento da psoriase, composições farmacêuticas contendo o dito anticorpo monoclonal e um veículo farmaceuticamente aceitável que reconhecem e que são capazes de alcançar uma eficácia clínica e histológica em pacientes com diferentes tipos clínicos de Psoriase.

A invenção refere-se também ao uso dos referidos anticorpos monoclonais humanizados para o diagnóstico *in vitro* de psoriase e a um reagente útil para o diagnóstico da psoriase contendo o mesmo anticorpo monoclonal e um veículo.