

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 96.409

REQUERENTE: INTERNATIONAL INSTITUTE OF CELLULAR AND
MOLECULAR PATHOLOGY, belga, com sede em
Avenue 75, B-1200, Brussels, Bélgica

EPÍGRAFE: "Processo para a preparação de composições far-
macêuticas contendo complexos de antigene/an-
ticorpo"

INVENTORES: Jean-Marie Saint-Remy,
Serge Lebeque,
Pierre Lucien Masson,
Philippe Lebrun,
Marc Jacquemin,

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

U.S.A., 03 de Janeiro de 1990, sob o Nº 7/460,514

4.

INTERNATIONAL INSTITUTE OF CELLULAR
AND MOLECULAR PATHOLOGY

"Processo para a preparação de composições
farmacêuticas contendo complexos de
antigene/anticorpo"

Âmbito da presente invenção

A presente invenção refere-se a composições farmacêuticas que contêm complexos antigene-anticorpo e à sua utilização no tratamento de doenças de auto-imunidade e na prevenção e tratamento de rejeições de enxertos, que resultam de reacções imunológicas do sistema imunológico orgânico.

O sistema imunológico faz normalmente a distinção entre os próprios componentes do organismo e os materiais estranhos invasores e proporciona mecanismos adequados para destruir ou conter os agentes estranhos perniciosos. No caso de existir uma doença de auto-imunidade o sistema imunológico não é capaz de fazer a distinção entre os determinantes próprios e não próprios daí resultando uma reacção imunológica contra esses mesmos determinantes e originando a lesão ou destruição das próprias células orgânicas.

Classificam-se as doenças de auto-imunidade humanas em duas categorias, isto é, distúrbios específicos orgânicos e distúrbios específicos não orgânicos. A miastenia grave é uma doença de auto-imunidade representativa da primeira categoria e o lupus erite-

matoso sistêmico é uma doença de auto-imunidade representativa da segunda categoria. A miastenia grave é uma doença neuromuscular que origina uma fraqueza muscular extrema. Normalmente, um impulso nervoso origina a libertação de acetilcolina a partir das vesículas nas placas da extremidade motora de um nervo. A acetilcolina assim libertada difunde-se através da união neuromuscular e combina-se com os receptores de acetilcolina nas fibras musculares confinantes. Este fenómeno induz a migração de iões de membrana com uma onda de despolarização que inicia o sinal eléctrico que origina a contracção muscular. Nos pacientes que sofrem de miastenia grave crê-se que os anticorpos igG para os receptores bloqueiam a ligação da acetilcolina aos receptores comprometendo a transmissão neuromuscular.

Os pacientes que sofrem desta doença respondem de modo variável a fármacos anti-colinesterase, timentomia, agentes imunossuppressores e plasmaferese. Utilizam-se muitas vezes os fármacos anti-colinesterase para tratar casos moderados de miastenia que se confinam aos músculos extra-oculares, mas estes medicamentos podem produzir uma fraqueza pronunciada e outros efeitos secundários desagradáveis. Apesar da natureza radical da timentomia este é o tratamento preferido para muitos pacientes jovens com uma doença relativamente grave ou progressiva, para qualquer paciente com miastenia generalizada ou com um quadro relativamente recente de sintomas e para alguns pacientes do sexo masculino mais idosos com timomas. Os glucocorticosteróides podem ser úteis em casos graves e são muitas vezes preferidos para qualquer paciente que sofra de miastenia generalizada. O tratamento com glucocorticosteróides suscita habitualmente um agravamento precoce e transitório seguido de uma melhoria

gradual. No entanto, o tratamento crônico com glucocorticóides pode produzir, independentemente, fraqueza e debilitação muscular devido ao comprometimento da proteína muscular e do metabolismo dos hidratos de carbono. A resistência à infecção também se encontra diminuída devido ao facto de os efeitos imunossuppressores se terem generalizado. A plasmaferese, embora seja eficaz na diminuição do teor de anticorpos, resulta muitas vezes num melhoramento clínico, mas os resultados são temporários e reservados com um procedimento de socorro para pacientes gravemente afectados que são resistentes a outras formas de terapia. Exceptuando possivelmente a timectomia nenhum destes tratamentos convencionais ataca a miastenia na sua origem mas apenas alivia, os sintomas da doença.

O lupus eritematoso sistémico (designado daqui em diante por "SLE") é um distúrbio multi-sistémico caracterizado pela presença de diversos auto-anticorpos que são responsáveis por lesões tecidulares de um modo imunopatológico. O anticorpo patogénico nos pacientes que sofrem de SLE dirige-se contra o ADN nativo de cordão duplo e os antígenos nucleares extraíveis (daqui em diante designado por "ENA").

O tratamento convencional para SLE assume diversas formas dependendo da gravidade e do tipo de envolvimento orgânico. A aspirina e outros agentes não esteróides anti-inflamatórios aliviam os sintomas que se manifestam nas formas moderadas de doença mas podem afectar de modo adverso a função hepática e renal. A terapia corticosteróide pode aliviar as exacerbações agudas que envolvem órgãos vitais, mas são necessárias habitualmente doses iniciais elevadas compreendidas entre 40 e 100 mg por dia de glucocorticóides (prednisona) e nos casos graves podem ainda ser necessárias dosagens mais

elevadas ou um tratamento mais prolongado. Para o controlo bem sucedido dos sintomas nos envolvimento recalcitrantes renais progressivos ou cerebrais necessita-se habitualmente de um tratamento contínuo com esteróides e com fármacos imunossupressores. Podem administrar-se os agentes citotóxicos com esteróides em casos mais graves, mas sabe-se que estes agentes originam efeitos secundários perigosos.

Os tratamentos convencionais para doenças de auto-imunidade que não sejam a miastenia grave e SLE podem envolver igualmente uma terapia esteróide, agentes imunossupressores e agentes anti-inflamatórios. Tal como no caso de miastenia grave e de SLE, estes tratamentos, exceptuando possivelmente a timectomia, não possuem a capacidade de atingir a fonte, mas apenas os sintomas da doença. Estes tratamentos são paliativos e não estão isentos de efeitos secundários adversos. De um modo ideal, o tratamento deveria visar apenas a eliminação da resposta auto-imunitária anormal mantendo intacta a capacidade de responder a outros antígenos.

A principal complicação imunológica da transplantação dos tecidos de uma pessoa para outra é a rejeição. Existem dois factores que determinam largamente a rapidez com que o enxerto é rejeitado: o grau de pré-sensibilização e a amplitude de compatibilidade entre o doador e o receptor. As rejeições hiperagudas imediatas resultam de anticorpos pré-formados contra o enxerto na circulação do receptor. Estes anticorpos podem resultar de uma incompatibilidade ABO, antes da transfusão, transplantação ou gravidez. Nos pacientes altamente sensíveis podem remover-se os anticorpos anti-HLA por substituição de plasma e mais recentemente por imunoadsorção extracorporal com proteína A estafilocócica. Mas apesar do trata-

mento com fármacos imunossupressores a nova síntese dos anticorpos continua a ser o problema principal. As rejeições agudas iniciam-se cinco dias ou mais após a transplantação e depois evoluem rapidamente. A rejeição crônica envolve uma perda gradual da função de um órgão transplantado.

Algumas reacções em enxertos, especialmente reacções imediatas hiperagudas e reacções crônicas são irreversíveis ou não respondem largamente ao tratamento. Torna-se, por isso, imperativa a prevenção de tais reacções. Conhecem-se diversos métodos convencionais para evitar as reacções a transplantações. A compatibilidade antigénica é considerada essencial para se evitarem todas as reacções hiperagudas, exceptuando talvez as transplantações da medula óssea. Os ensaios de pré-sensibilização também são importantes e efectuaram-se determinando a presença no doador de anticorpos linfocitotóxicos dependentes do complemento, anticorpos que são mediadores da citotoxicidade celular e células T assassinas que têm reactividade contra os antígenos das transplantações do doador. Mas a compatibilidade antigénica e os ensaios de pré-sensibilidade antes de um aloenxerto apenas diminuem e não eliminam o risco de rejeição.

As técnicas de imunossupressão são muitas vezes eficazes, reduzindo posteriormente o risco de rejeição e podem auxiliar a parar a rejeição do enxerto, quando esta ocorre. As técnicas típicas de imunossupressão no caso de transplantações renais envolvem a administração de corticosteróides, tais como a metilprednisolona e a prednisona e a administração de azatioprina durante longos períodos a seguir à transplantação. Podem prescrever-se transfusões sanguíneas, a partir do doador especialmente antes de transplantações

renais. Utiliza-se a irradiação linfóide nas transplantações renais para completar as medidas de imunossupressão quando os pacientes já têm uma história de rejeição a transplantes renais e estão em risco de rejeitarem precocemente transplantes subsequentes.

A transplantação bem sucedida de tecidos vivos constitui, apesar de tudo isto, um problema grave. Uma elevada percentagem de rejeições é inevitável e não responde aos tratamentos convencionais. A terapia imunossupressora prolongada suprime os aspectos benéficos do sistema imunitário e pode aumentar o risco de infecções que não estão associadas.

Pode encontrar-se informação adicional neste âmbito em Kohler et al., "The Autoimmune Diseases," Fink et al., "Immunological Aspects of Neurological and Neuromuscular Diseases," e Kirkpatrick et al., "Transplantation Immunology," Journal of the American Medical Association, Vol. 248, No. 20, pp. 2646-57, 2710-15 e 2727-33, 26 de Novembro de 1982, e Roitt et al., Immunology, copyright 1985 by Gower Medical Publishing Ltd., London. Pode obter-se mais informação em "Myasthenia Gravis," Lindstrom et al., Advances in Immunology, 1988, Vol. 42, pp. 233-284, "Immune Recognition of Antigen and its Relevance to Autoimmune Disease: Recent Advances at the Molecular Level," Eur. J. of Clin. Investigation, 1989, Vol. 19, pp. 107-116 e "Organ Specific Autoimmunity: A 1986 Overview," Immunological Reviews, 1986, No. 94, pp. 136-169.

De acordo com o anteriormente exposto é um objecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica e um método para o tratamento eficaz de doenças de auto-imunidade e para o alívio de sintomas associados à doença.

Constitui um outro objecto da presente invenção propor-

cionar uma composição farmacêutica e um método para alterar o curso das doenças de auto-imunidade sem produzir efeitos secundários indesejáveis.

Constitui um outro objecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica e um método para o tratamento de doenças de auto-imunidade sem recorrer a cirurgia.

Constitui um outro objecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica e um método para o tratamento de doenças de auto-imunidade que levem a um melhoramento seguro relativamente rápido e permanente da sintomatologia da doença.

Constitui um outro objecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica e um método para a prevenção de reacções a transplantações.

Constitui um outro objecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica e um método para o tratamento de rejeições a transplantações.

Constitui um outro objecto da presente invenção proporcionar uma composição farmacêutica e um método para diminuir o nível de anticorpos envolvidos na rejeição de um enxerto sem supressão de todo o sistema imunitário.

Outros objectivos da presente invenção tornar-se-ão evidentes a partir da descrição pormenorizada que se seguirá.

Sumário da Presente Invenção

A presente invenção satisfaz estes objectivos proporcionando composições farmacêuticas que contêm complexos imunitários de antígenos e de anticorpos purificados específicos para esses

antigenes e veículos ou diluentes fisiologicamente aceitáveis. Seleccionaram-se os antigenes a partir de um grupo de antigenes que origina reacções imunológicas associadas a doenças auto-imunitárias e a rejeições de enxertos. Os antigenes e os anticorpos encontram-se presentes numa proporção na qual essencialmente todos os sítios de ligação dos referidos antigenes se encontram bloqueados pelos referidos anticorpos, de tal modo que os antigenes não produzem essencialmente reacções imunológicas quando administrados ao paciente. Administram-se as composições para tratar doenças de auto-imunidade e para evitar ou tratar rejeições a transplantações.

Descrição Pormenorizada dos Aspectos Preferidos

A presente invenção proporciona numerosas vantagens sobre os métodos convencionais no tratamento de doenças de auto-imunidade. Em primeiro lugar, crê-se que seja universal para todas as doenças de auto-imunidade proporcionando assim um instrumento versátil e eficaz no tratamento de muitos distúrbios. As doenças de auto-imunidade que foram previamente e largamente mas não completamente controladas, de acordo com as técnicas convencionais, são agora melhor tratadas e de um modo mais seguro e conveniente com a presente invenção. Os pacientes que sofrem doenças de auto-imunidade mais graves, que no passado não respondiam largamente ao tratamento convencional, encontraram agora alívio com o tratamento da presente invenção.

Em segundo lugar, a presente invenção é simples e fácil de pôr em prática. O ingrediente eficaz da presente invenção é um complexo imunológico do(a) antigene que suscita uma resposta imunoló-

gica associada à doença e do anticorpo dirigido contra o antigene. Identificaram-se antigenes em diversas doenças de auto-imunidade encontrando-se por vezes estes antigenes comercialmente disponíveis. Nestes casos, pode preparar-se facilmente o complexo imunitário da presente invenção ou pode purificar-se ou isolar-se o anticorpo para esses antigenes e efectuar uma mistura de antigenes e anticorpos em proporções seleccionadas. Para outras doenças de auto-imunidade em que os antigenes que lhe estão associados foram identificados mas não se encontram comercialmente disponíveis a preparação de um complexo imunitário necessita de passos adicionais de isolamento e purificação, de síntese ou de construção genética do antigene de acordo com as técnicas conhecidas na especialidade. Para outras doenças de auto-imunidade para as quais ainda não se identificou o antigene patogénico, pode dispôr-se dos resultados da presente invenção após a descoberta do antigene causal.

Em terceiro lugar, a composição farmacêutica, devido à sua natureza, causa pouca ou nenhuma toxicidade. Num aspecto preferido, o complexo imunológico é constituído por um antigene e um anticorpo idêntico ao que já está presente no paciente. Os outros componentes da composição são farmacologicamente compatíveis e podem, por outro lado, variar numa latitude considerável, do modo a evitar qualquer possibilidade de reacção adversa que possa ser específica de um determinado indivíduo. A simplicidade e a natureza largamente original da composição também permite que o tratamento de acordo com a presente invenção possa ser combinado de modo seguro e eficaz com terapias de técnicas anteriores desde que sejam benéficas.

Em quarto lugar, a presente invenção não possui as muitas

outras desvantagens dos tratamentos convencionais e proporciona ainda resultados comparáveis ou superiores. Fundamentalmente, a presente invenção actua a nível causal e em muitos casos faz parar o curso da doença. O tratamento bem sucedido, de acordo com a presente invenção, permite a utilização de níveis de dosagem muito pequenos num período relativamente curto e ao prognóstico de cura completa e interrupção do tratamento é, em muitos casos, muito bom. A presente invenção requer ao mesmo tempo procedimentos não radicais, tal como no caso da remoção de órgãos ou de substituição de plasma, e não suprime a defesa imunológica do organismo contra os antígenos não relacionados com a doença. Será evidente para o especialista que existem ainda outras vantagens da presente invenção.

Do mesmo modo, a presente invenção apresenta numerosas vantagens relativamente às técnicas convencionais para a prevenção ou tratamento de rejeições em enxertos. Crê-se que a presente invenção seja universalmente aplicável a todos os tipos de reacções imunológicas em enxertos. A composição da presente invenção prepara-se de um modo simples, tal como no caso da sua utilização no tratamento de doenças de auto-imunidade, sendo a principal diferença a selecção do antígeno e do respectivo anticorpo. A presente invenção previne ou trata de um modo eficaz as rejeições a enxertos, evitando ainda lesões tecidulares e outras desvantagens das técnicas convencionais.

Desconhece-se o modo específico da acção segundo a qual a presente invenção atinge os seus bons resultados, mas põe-se a hipótese de que os benefícios provenham da ocorrência de um complexo imunológico antígeno-anticorpo que esteja inevitavelmente

presente nas misturas presentemente descritas de antigene e anticorpo. Crê-se que os complexos imunológicos estimulem a produção de anticorpos anti-idiotípicos contra os anticorpos que são específicos do antigene patogénico. Por seu lado, os anticorpos anti-idiotípicos suprimem a produção de anticorpos a nível celular ou possivelmente a nível humoral. Esta hipótese permite uma melhor compreensão da presente invenção mas não deve, de modo algum, ser considerada como um limite do âmbito das reivindicações em anexo.

São susceptíveis de ser tratadas com a presente invenção todos os tipos de doença imunitária em que auto-antigenes marcados se encontram envolvidos na patogénese de doenças específicas não orgânicas ou de doenças específicas orgânicas. As doenças orgânicas específicas incluem a miastenia grave, a doença de Addison, tiroidite, diabetes dependentes de insulina e diabetes independentes da insulina, doença de Grave, gastrite crónica atrófica, uveíte, esclerose múltipla, anemia hemolítica de auto-imunidade, púrpura ideopática trombocitopénica, síndrome de Goodpasture, alguns casos de infertilidade masculina, vitiligo e pênfigos. As doenças orgânicas não específicas são o lupus eritematoso sistémico, o escleroderma, a doença de Sjögren, arterite reumatóide e doenças mistas dos tecidos conjuntivos.

O antígeno seleccionado para o complexo imunológico da presente invenção origina uma reacção patogénica imunológica associada com a etiologia da doença da auto-imunidade ou com a rejeição da transplantação que se pretende tratar. Para o tratamento de qualquer distúrbio específico, a composição inclui geralmente um único antigene causal mas a composição inclui múltiplos antigenes e as respectivas múltiplas famílias dos anticorpos

para esses mesmos antígenos quando se sabe que existe uma pluralidade de antígenos patogenicamente envolvidos. O antígeno é o receptor da acetilcolina (AChR) no caso de miastenia, no citoplasma das células adrenais no caso de doença de Addison, de tiroglobulina (Tg) e/ou antígeno microsômico da tireóide (TMA) no caso de tireoidite de auto-imunidade, o receptor de insulina no caso de diabetes resistentes a insulina, células dos ilheus e/ou insulina no caso de diabetes dependentes de insulina, o receptor da hormona estimulante da tireóide (TSH-R) no caso de doença de Grave, microssomas das células gástricas no caso de gastrite atrófica, o antígeno S da retina no caso de uveíte, mielina no caso de esclerose múltipla, glóbulos vermelhos no caso de anemia hemolítica por auto-imunidade, plaquetas no caso de púrpura trombocitopênica idiopática, colagénio de tipo IV no caso do síndrome de Goodpasture, espermatozóide no caso de infertilidade masculina, melanócitos no caso de vitiligo e componentes cutâneos no caso de penfigo. Os antígenos são constituídos por ADN de cordão duplo e/ou ENA no caso do lúpus eritematoso, SS-A/Ro e SS-B/La no caso do síndrome de Sjögren, RNP no caso de doenças mistas do tecido conjuntivo, Scl 70 e centrómeros no caso de escleroderma e a região Fc de IgG no caso da arterite reumatóide. Os antígenos que se encontram envolvidos nas rejeições de enxertos são antígenos do doador tais como antígenos ABO e MHC da classe I e da classe II.

Encontram-se comercialmente disponíveis diversos dos antígenos anteriormente identificados. Estes antígenos incluem: tiroglobulina humana (Dako Corporation, Santa Barbara, Califórnia 93103, Accurate Chemical e Scientific Corp., Westbury, New York 11590); colagénio humano do tipo IV (Southern Biotechnology

Associates, Inc., Birmingham, Alabama 35226); insulina humana (Peptides International, Louisville, Kentucky 40223); e proteína básica da mielina (Chemicon International, Inc., El Segundo, California 90245). Devido ao facto de os anticorpos reagirem apenas com os seus antígenos específicos quase todas as preparações de antígenos são adequadas, mesmo as de antígenos sob a forma de extractos brutos, desde que estes estejam isentos de substâncias tóxicas. No entanto, a utilização de preparações puras ou relativamente puras de antígenos é preferencial, uma vez que é então mais fácil verificar e controlar a quantidade de antígeno presente, o que é importante no controlo das doses.

Para muitas das doenças para as quais a presente invenção é dirigida apenas se encontram facilmente disponíveis a antígenos relativamente impuros. De um modo geral, estes antígenos podem ser purificados para a utilização eficaz na presente invenção de diversas técnicas. Em alguns casos, a purificação a partir de material humano é uma abordagem viável que depende da natureza do próprio antígeno. Por exemplo, materiais derivados de biópsias ou de amostras de tecidos (receptor de acetilcolina ou antígeno-S da retina) serão difíceis de utilizar enquanto o material derivado do sangue terá uma utilização prática e mais adequada como uma fonte (por exemplo, proteínas derivadas de plaquetas).

Uma fonte alternativa de antígenos que em alguns casos ultrapassa as dificuldades práticas envolvidas na purificação a partir de material humano são os antígenos derivados de material não humano, tais como AChR da enguia eléctrica. As diferenças imunológicas entre os antígenos de origem humana e não humana não é significativa em determinados casos em que os antígenos animais têm

uma alto grau de similaridade com os correspondentes humanos. A praticabilidade desta abordagem aumenta devido ao facto de um antígeno da presente invenção estar presente sob a forma de um complexo que se crê que reduza a imunogenicidade de um antígeno não humano.

Existem ainda outras fontes de antígenos suficientemente purificados. A identificação de uma precisão crescente da natureza dos antígenos envolvidos nas doenças de auto-imunidade torna possível a produção desses antígenos de acordo com técnicas de construção genética e similares. Quando se dispõe de um conhecimento preciso de antígenos, podem produzir-se pelo menos partes de uma macromolécula, por exemplo, epítopes específicos, por síntese química. Ainda uma outra fonte de antígenos pode consistir na utilização da imagem interna do antígeno, dado que, como se sabe, os anticorpos anti-idiotípicos podem simular determinados epítopes do antígeno original. Utilizou-se esta abordagem experimentalmente na preparação de vacinas em que o próprio antígeno representa um potencial risco de infecção.

Conhecem-se exemplos específicos de preparação de antígenos por engenharia genética e por síntese. A clonagem de TSH-R, por exemplo, encontra-se descrita em "Molecular Cloning of a cDNA Encoding a Human Thyrotropin Receptor," 8th Int. Congress of Endocrinology, 1988 Kyoto, Japan, p. 1175, No. 04-22-052. Existem outras técnicas que são aplicáveis aos antígenos que são portadores de um pequeno número de determinantes antigénicos constituídos por um pequeno número de aminoácidos, usualmente 3 a 6. Sintetizam-se estes determinantes antigénicos in vitro e ligam-se habitualmente a proteínas veículo com graus variáveis de substituição. Como alternativa, purificam-se e sequenciam-se os determinantes antigénicos e determina-se a sequência de ADN correspondente. Introduce-se

este ADN no genoma de um microrganismo que se utiliza para sintetizar o antigene in vitro. Referências adicionais em que se descrevem técnicas de engenharia genética adequadas incluem (1) T. Maniatis et al., Molecular Cloning, published 1982 by Cold Spring Harbor Laboratory, (2) B. Wallace et al., Solid Phase Biochemistry, pág. 631, publicado em 1983 por J. Wiley & Sons, New York (editado por W. Scouten), e (3) K. Murray, Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Part B, Vol. 290 (1980) 369-386.

Ainda noutros aspectos específicos, o antigene é quimicamente modificado por glutaraldeído, derivados de etilenoglicol ou similares.

Crê-se que os antígenos causais existam mas ainda não estão positivamente identificados para determinadas outras doenças de auto-imunidade. Nestes casos, a presente invenção inclui um passo de preparação adicional para a identificação do antigene. A aplicabilidade universal da presente invenção possibilita a sua implementação directa após a descoberta dos antígenos patogénicos até agora desconhecidos.

Uma vez seleccionado o antigene, obtém-se um anticorpo para esse mesmo antigene a partir de três fontes possíveis:

- (a) animais imunizados;
- (b) doadores individuais de sangue e plasma agregado a partir de múltiplos doadores; e
- (c) o próprio paciente.

É preferível utilizar anticorpos do próprio paciente, devido ao facto de o paciente possuir normalmente maiores quantidades de anticorpos específicos necessários do que o terão os doadores de sangue. Por outro lado, a utilização de anticorpos a partir de plasma agregado é comercialmente desejável, uma vez que permite a preparação

de complexos antigene-anticorpo pré-embalados sem o envolvimento do paciente. Os anticorpos de origem animal são, geralmente, os menos aconselhados, devido ao risco de reacções secundárias adversas.

O anticorpo será policlonal ou monoclonal e encontra-se presente num dos aspectos e sob a forma de uma fracção Ig ou sob uma forma mais purificada tal como $F(ab')_2$. A utilização de anticorpos policlonais diminui o risco de reacções antigénicas contra determinantes antigénicos incompatíveis. Um método para a preparação de anticorpos monoclonais encontra-se descrito em "Immunochemical Techniques - Part 1 - Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies", Methods in Enzymology, Vol. 121, editado por J. J. Langone et al. e publicado em 1986 por Academic Press, Inc.

De preferência, purifica-se o anticorpo. A purificação tem a vantagem de remover materiais terapeuticamente irrelevantes. A associação do antigene com o anticorpo no soro pode originar entre outras coisas a activação do complemento. O aparecimento do complemento na superfície do complexo antigene-anticorpo pode interferir com o comportamento in vivo pretendido para o complexo.

Pode purificar-se adequadamente o anticorpo de acordo com várias técnicas conhecidas. Uma dessas técnicas envolve a absorção específica sobre o respectivo antigene que se tinha insolubilizado por acoplamento a uma base sólida. Depois, recupera-se o anticorpo por eluição sob condições que dissociam o complexo antigene-anticorpo, tais como condições de pH extremo ou pela utilização de agentes caotrópicos. Os exemplos que se seguem ilustram estas técnicas.

Prepararam-se as composições da presente invenção misturando o antigene ou antigenes com o respectivo anticorpo ou anti-

corpos numa forma adequada ao modo particular de administração seleccionado. A proporção de antigene para anticorpo depende largamente do tamanho do antigene, uma vez que o número de determinantes antigénicos no antigene é geralmente proporcional ao peso molecular do antigene. Deverá utilizar-se anticorpos suficientes para bloquear essencialmente todos os sítios de ligação disponíveis no antigene, de tal modo que não existe praticamente qualquer efeito antigénico devido ao antigene quando se administra a composição. A quantidade mínima de anticorpo é normalmente o equivalente molar para reacção com o antigene e o anticorpo encontra-se preferencialmente num excesso molar. Se se desejar, ensaios de rotina revelarão para qualquer antigene específico e para qualquer anticorpo a quantidade mínima de anticorpo a ser utilizada. Não existe uma quantidade máxima de anticorpo, mas por uma questão de segurança utiliza-se um excesso molar de até cerca de 500. Pode utilizar-se um excesso de anticorpos ainda maior, mas seria um desperdício de material valioso. Deste modo uma relação molar adequada de antigene-anticorpo estará compreendida entre 1:1 e 1:500 e de preferência entre pelo menos cerca de 1:3 e 1:500.

Um método simples para a preparação de misturas de antigene e anticorpo que evita a necessidade de se purificar o antigene ou o anticorpo consiste na utilização de imuno-precipitados. Num dos aspectos prepara-se o precipitado por incubação de uma preparação impura de imunoglobulina a partir do plasma ou do soro do paciente com o antigene e depois centrifuga-se. O processo de precipitação é acelerado pela adição de polímeros, tais como politilenoglicol e dextrano ou de reagentes biológicos, tais como factor reumatóide ou factor Clq do complemento. Estas técnicas são bem conhecidas e encontram-se ilustradas nos exemplos que se seguem.

As composições da presente invenção contêm outros componentes, além do antigene e do anticorpo. No caso de se tratar de composições injectáveis os componentes adequados incluem albumina humana para evitar a desnaturação do anticorpo, agentes antissépticos, tais como fenol, e adjuvantes, tais como peptidoglicanos e cristais de tirosina.

Os veículos adequados para a composição quando se trata de uma forma injectável incluem água destilada ou de preferência solução salina ou solução salina tamponizada. Nos aspectos preferidos a composição inclui o veículo constituído por solução salina de 9 g por litro de cloreto de sódio ou um veículo constituído por uma solução salina tamponizada que tem um pH de 7,4. Os veículos adequados têm um baixo poder de irritabilidade, por exemplo têm pH neutro e uma força iónica fisiológica. A selecção de outros veículos e diluentes aceitáveis sob o ponto de vista farmacêutico para utilização nas composições é da competência do especialista.

As composições da presente invenção são preparadas sob diversas formas, dependendo do modo de administração. Preparam-se de um modo adequado sob uma forma injectável esterilizada, sob a forma de uma implantação de libertação lenta, uma forma adequada para aplicação local nas mucosas nasais, brônquicas, lacrimais e/ou gastrointestinais, caso em que são adequadamente administrados sob a forma de aerossol ou de pulverização ou numa forma semelhante, tal como gotas para os olhos ou nasais, ou sob a forma de cápsulas entéricas protegidas ou similares. O especialista verificará que se poderão utilizar outras formas adequadas.

Quando se preparam as composições sob a forma líquida, os líquidos são soluções ou suspensões adequadas. Armazenam-se os líquidos em ampolas ou liofilizam-se e restituem-se imediatamente

antes de se utilizarem. As composições da presente invenção são completamente estáveis e podem ser normalmente armazenadas em ampolas esterilizadas a 4°C durante um período limitado ou a -20°C durante 12 a 24 meses. Quando liofilizadas, o seu tempo de vida em armazém é muito mais longo.

As composições injectáveis da presente invenção podem ser injectadas por via intradérmica, subcutânea, intramuscular e, com grande precaução, por via intravenosa. Dá-se preferência à via intradérmica devido ao facto de poder originar uma reacção cutânea muito clara se o anticorpo estiver presente numa quantidade insuficiente para neutralizar o antigene. A frequência das injeções varia largamente, por exemplo, desde a aplicação diária até à aplicação anual, dependendo do antigene, da gravidade da doença e da fase de tratamento.

O vigor das composições expressa-se preferencialmente em termos de concentração do antigene e da relação antigene-anticorpo. Uma dose adequada para o antigene é de cerca de 1 nanograma a cerca de 100 microgramas e a relação antigene-anticorpo selecciona-se do modo a evitar a antigenicidade do antigene. A dose antigénica inicial é de preferência relativamente pequena, como medida de precaução contra reacções adversas inesperadas, e depois é aumentada em administrações subsequentes para um nível mais eficaz. Verifica-se a eficácia do tratamento fazendo uma estimativa do nível de anticorpos contra auto-antigenes e do status clínico do paciente no caso de uma doença de auto-imunidade. A eficácia do tratamento é comprovada calculando os títulos de anti-ABO ou HLA e observando os indícios de rejeição de transplantações no caso de transplantações. É possível que seja necessário atingir uma dose limiar de complexos antigene-anticorpo antes de se notar qualquer melhoria clínica.

O especialista verificará facilmente que se podem efectuar modificações nas técnicas presentemente descritas de preparação na prática da presente invenção encontrando-se essas modificações no âmbito da presente invenção e das reivindicações em anexo. Para uma melhor compreensão da presente invenção, os exemplos que se seguem ilustram como se preparam e como se utilizam as composições da presente invenção.

EXEMPLO 1

Preparação e Utilização de Composições para o Tratamento de Miastenia Grave

Devido às quantidades extremamente baixas de receptor disponíveis de tecido humano, a purificação de AChR neuromuscular foi efectuada a partir de órgãos eléctricos de enguias (*Torpedo marmorata*). Cortou-se e homogenizou-se o órgão eléctrico recentemente descongelado (200 g) em 200 ml de tampão fosfato 10 mM contendo EDTA, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM e azida de sódio a 0,01%, a pH 7,4 (tampão A). Centrifugou-se o homogeneizado a 20 000 xg durante 1 hora e extraíu-se o sedimento com 200 ml de tampão A contendo 1% (v/v) de Triton X-100 a 4°C durante 16 horas. Centrifugou-se o extracto a 100 000 X g durante 1 hora e reteve-se o sobrenadante. Aplicou-se o extracto (100 ml) a 50 ml de uma resina de afinidade preparada por imobilização de 25 mg de α -cobratoxina sobre sefarose CL-4B com brometo de cianogénio.

Decorridas 2 horas a 20°C, lavaram-se as gotas com tampão A contendo Triton X-100 a 0,1% (tampão B) e NaCl 1mM e apenas com tampão B. Depois eluíram-se as gotas com 20 ml de carbacol 1M (Sigma, St. Louis, MO.) em tampão B durante 5 horas a 20°C.

Após centrifugação, dialisou-se o sobrenadante durante a noite a 4°C contra 2 litros de tampão B sem EDTA (tampão C). Aplicou-se este material a uma coluna de 2 ml de DEAE-celulose (Whatman DE52, Maidstone, Kent) previamente equilibrada com tampão C. Lavou-se a coluna com 1 litro de tampão C e eluiu-se o receptor utilizando o tampão C contendo NaCl 0,5 M. Recolheram-se fracções de 1 ml. (Ver Eur. J. Immunol., Vol. 12, (1982) 757-761, Barkas T. et al.)

Pode utilizar-se esta preparação para o isolamento de anticorpos específicos anti-AChR; contudo, o antigene recombinante seria mais adequado para complexos imunológicos a serem injectados. Ver "Mapping of the Main Immunogenic Region and Toxin Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor"; Barkas et al., Science, Vol. 235, (1988), 77-80.

Efectuou-se a precipitação de 100 ml de soro de um paciente que sofria de miastenia grave adicionando 100 ml de 36 g/l de Na_2SO_4 , efectuou-se a nova suspensão em solução salina com tampão fosfato (PBS) e dialisou-se extensivamente contra o mesmo tampão. Depois passou-se a solução que continha todas as imunoglobulinas através de uma coluna de filtração em gel TSK 55 (fabricado por E. Merck AG, Darmstadt, Alemanha) para se separar a IgG da IgM. Reuniram-se as fracções que continham IgG, concentraram-se por ultrafiltração até cerca de 20 ml e dialisaram-se contra PBS. Depois passou-se a fracção IgG sobre sefarose coberta com o receptor neuromuscular do peixe Torpedo e lavou-se cuidadosamente a coluna e os anticorpos adsorvidos foram recuperados por eluição com ácido cítrico 50 mM a pH 2,6. Depois restaurou-se imediatamente o pH para 7,4 e concentrou-se a solução até 2 a 5 ml, dialisou-se contra PBS e armazenou-se a -20°C até à utilização. Misturou-se o antigene numa

relação de 1:10 em peso com os anticorpos específicos isolados a partir de um único paciente. Inoculou-se por via intradérmica a mistura de antigene e anticorpos.

Após ter-se ilustrado a realização prática da presente invenção, em relação a diversos aspectos específicos, o especialista verificará que os elementos da presente invenção poderão variar, tais como a dosagem antigênica, a relação antigene-anticorpo, o veículo ou diluente, aditivos, técnicas de preparação e modos e periodicidade de administração de modo adequado a tratar doenças de auto-imunidade e a prevenir ou tratar reacções de rejeição.

Será evidente para o especialista que esta e outras modificações se encontram abrangidas pelo âmbito e espírito da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1.- Processo para a preparação de composições farmacêuticas adequadas para administração a seres humanos na prevenção ou tratamento de doenças imunológicas, caracterizado pelo facto de se incorporar:

um complexo imune de um antigene e de um anticorpo purificado específico para o mesmo, sendo o referido antigene seleccionado entre o grupo constituído por antigenes que provocam reacções imunológicas patogénicas em doenças autoimunes e rejeições de transplantes e estando o referido antigene e anticorpo presentes em uma proporção molar compreendida entre cerca de 1:1 e cerca de 1:500 de modo que o referido anticorpo bloqueia essencialmente todos os sítios de ligação do referido antigene,

o qual está presente em uma dose compreendida entre 1 nanograma e 100 microgramas aproximadamente; e

um diluente ou veículo farmacologicamente aceitável.

2.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para o tratamento de doenças autoimunes, caracterizado pelo facto de o referido antigene ser seleccionado entre o grupo constituído por antigenes que provocam reacções imunológicas patogénicas em doenças autoimunes.

3.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de a doença autoimune ser a) diabetes juvenil, b) miastenia grave, c) esclerose múltipla, d) síndrome de Goodpasture, e) tiroidite, f) doença celíaca, g) vasculite, h) lupus sistémico eritematoso, ou i) uveíte e de o referido antigene ser um antigene respectivo seleccionado entre o grupo constituído por a) ilhota da célula de Langerhans beta, insulina e/ou receptor de insulina, b) receptor de acetil-colina, c) proteína de mielina básica, d) colagénio-4, e) tiroglobulina, f) gliadina, g) citoplasma PMN e/ou fosfatase alcalina, h) ADN de cordão duplo e/ou antigenes nucleares extractíveis (ENA) e i) antigenes da retina.

4.- Processo de acordo com a reivindicação 2, caracte-

rizado pelo facto de a referida doença autoimune ser a) anemia de Biermer, b) hipertiroidite, c) artrite reumatóide, ou d) tiroidite e por o referido antigene ser um antigene respectivo seleccionado entre o grupo constituído por a) células parietais gástricas, b) mitocondria, c) colagénio-2, e d) LATS.

5.- Processo de acordo com a reivindicação 1, para a preparação de composições farmacêuticas apropriadas para a prevenção ou o tratamento de rejeições de transplantes, caracterizado pelo facto de o referido antigene ser seleccionado entre o grupo constituído por antigenes que provocam as referidas rejeições de transplantes.

6.- Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo facto de o referido antigene ser seleccionado entre o grupo constituído por antigenes de ABO e MHC classe 1 e 2.

7.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido anticorpo ser derivado de um ser humano.

8.- Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo facto de o referido anticorpo ser derivado de plasma combinado a partir de dadores múltiplos.

...

9.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de incluir os passos de remoção do referido anticorpo a partir de plasma humano, purificação do referido anticorpo e mistura do anticorpo purificado com o antigene.

10.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o referido anticorpo estar presente, relativamente ao antigene, em um excesso molar.

11.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a proporção molar antigene/anticorpo ser de pelo menos cerca de 1:3.

12.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o veículo ou diluente possuir um pH aproximadamente neutro.

13.- Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o referido veículo ser um líquido e de se preparar a composição sob uma forma estéril injectável.

14.- Processo de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo facto de o referido líquido ser uma solução salina (soro fisiológico).

...

15.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se preparar a composição sob a forma de um implante de libertação lenta, uma aspersão, um aerossol, gotas ou uma dose oral.

16.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se preparar a composição sob uma forma liofilizada.

17.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de se incorporarem adicionalmente dois ou mais antígenos e duas ou mais famílias respectivas de anticorpos para os mesmos.

18.- Processo para a preparação de uma composição farmacêutica apropriada para administração a seres humanos no tratamento de miastenia grave, caracterizado pelo facto de se incorporar:

um complexo imune de receptor de acetilcolina e um anticorpo purificado específico para o mesmo, estando o referido receptor de acetilcolina e o anticorpo presentes em uma proporção tal que o referido anticorpo bloqueia essencialmente todos os sítios de ligação do referido receptor de acetilcolina; e

um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

...

19.- Processo para a preparação de uma composição farmacêutica adequada à administração a seres humanos no tratamento de lupus sistémico eritematoso, caracterizado pelo facto de se incorporar:

um complexo imune de ADN e um anticorpo purificado específico para o mesmo, estando o referido ADN e o anticorpo presentes em uma proporção tal que o referido anticorpo bloqueia essencialmente todos os sítios de ligação do referido ADN; e

um diluente ou veículo farmacologicamente aceitável.

20.- Método para evitar ou tratar uma doença imunológica em um paciente, caracterizado pelo facto:

de se seleccionar uma composição farmacêutica adequada para administração a seres humanos constituída por um complexo imune de um antigene e um anticorpo purificado específico para o mesmo, sendo o referido antigene seleccionado entre o grupo constituído por antígenos que provocam reacções imunológicas patogénicas em doenças autoimunes e rejeições de transplantes, estando o referido antigene e o anticorpo presentes em uma proporção tal que o anticorpo bloqueia essencialmente todos os sítios de ligação do antigene, e um diluente ou veículo farmacologicamente aceitável; e

de se administrar a referida composição ao paciente.

21.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracteri

zado pelo facto de se incorporar adicionalmente o passo de se obter o referido anticorpo a partir do referido paciente.

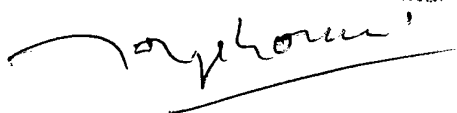
22.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de se incorporar adicionalmente o passo de se obter o referido anticorpo a partir de um plasma combinado de dadores múltiplos.

23.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de o passo da administração incluir a injeção da referida composição.

24.- Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo facto de o passo da administração incluir a administração da composição sob a forma de um aerossol, cápsula entérica ou gotas de um líquido viscoso.

Lisboa, 2 de Janeiro de 1991

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



R E S U M O

"PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO
COMPLEXOS DE ANTIGENE/ANTICORPO"

A presente invenção refere-se a um processo para a preparação de uma composição farmacêutica adequada para a administração a seres humanos na prevenção ou tratamento de doenças imunológicas, mediante incorporação de:

um complexo imune de um antígeno e um anticorpo purificado específico para o mesmo, sendo o antígeno seleccionado entre um grupo constituído por antígenos que provocam reacções imunológicas patogénicas em doenças autoimunes e rejeições de transplantes, e estando o antígeno e o anticorpo presentes em uma proporção que permite que o anticorpo bloqueie essencialmente todos os sítios de ligação do antígeno; e um diluente ou veículo farmacologicamente aceitável.

A invenção também proporciona um método de administração da composição para tratamento de doenças autoimunes e tratamento ou prevenção de rejeições de transplantes.

Lisboa, 2 de Janeiro de 1991
O Agente Oficial da Propriedade Industrial,

Mykhailo