

(11) *Número de Publicação:* PT 92071 B

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61K047/48 A

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1989.10.20	(73) <i>Titular(es):</i> AKZO NV. VELPERWEG 76 6924 BM ARNHEM NL
(30) <i>Prioridade:</i> 1988.10.21 EP 88202349	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1990.04.30	(72) <i>Inventor(es):</i> HERMANUS ANTONIUS MARIA VERHEUL NL
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 12/94 1994.12.13	(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE IMUNOTOXINAS E DE PREPARADOS FARMACÉUTICOS PARA O TRATAMENTO OU PROFILAXIA DE DOENÇAS AUTO-IMUNES

(57) *Resumo:*

[Fig.]

10

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 92 071

REQUERENTE: AKZO N.V., holandesa, industrial, com sede em
Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, Holanda.

EPÍGRAFE: " PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE IMUNOTOXINAS E
DE PREPARADOS FARMACÊUTICOS PARA O TRATA-
MENTO OU PROFILAXIA DE DOENÇAS AUTO-IMUNES"

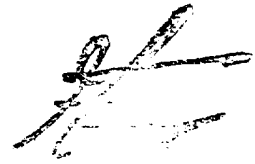
INVENTORES: Hermanus Antonius Maria Verheul.

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

Patente Europeia, com o n.º. 88.202349.2
em 21 de Outubro de 1988.

70 096
OA/2587-511

PATENTE Nº. 92 071



"Processo de preparação de imunotoxinas e de preparados farmacêuticos para o tratamento ou profilaxia de doenças auto-imunes"

para que

AKZO N.V., pretende obter privilégio de invenção em Portugal.

R E S U M O

O presente invento refere-se ao processo de preparação de imunotoxinas para o tratamento ou profilaxia de uma doença auto-imune, compreendendo a imunotoxina um epítopo, reconhecido pelos linfócitos T, sendo característico para a doença auto-imune específica ou um seu análogo reactivo cruzadamente.

O processo compreende acoplar o epítopo ou o seu análogo reactivo cruzadamente, a uma substância citotóxica, quer directamente quer por meio de um ligante.

O invento refere-se ainda ao processo de preparação de preparados farmacêuticos contendo uma ou mais imunotoxinas.



MEMÓRIA DESCRITIVA

O presente invento refere-se ao processo de preparação de imunotoxinas para o tratamento ou profilaxia de uma doença auto-imune e ao processo de preparação de preparados farmacêuticos contendo uma ou mais imunotoxinas.

O sistema imune exhibe uma complexidade, que inclui um requisito para o auto-reconhecimento. A regulação do sistema imune ocorre através deste auto-reconhecimento e pode envolver células, anticorpos, sistemas de amplificação (p.e. complemento) e combinações destes elementos. Em indivíduos saudáveis o sistema imune responderá à exposição a uma substância estranha por activação da resposta imune celular e/ou por produção de anticorpos específicos contra esta substância. Por outro lado, o sistema imune é geralmente tolerante aos constituintes do próprio corpo, a assim denominado auto-tolerância. A auto-imunidade pode ser definida como um engano desta auto-tolerância.

Entre as doenças auto-imunes podem ser mencionadas: esclerose múltipla, em que o tecido atacado é a mielina; miastenia grave, em que o alvo é uma molécula receptora para o importante neurotransmissor da acetilcolina; artrite reumatóide, em que inter alia são alvejadas as articulações periféricas, diabetes mellitus do tipo I, caracterizada por as células produtoras de insulina serem destruídas e lupus eritematoso sistémico em que são atacados os vasos sanguíneos, pele e rim.

As doenças auto-imunes podem ser iniciadas sem o requisito para um agente externo específico. A perda de tolerância aos auto-antigénios pode ser causada pelo próprio auto-antigénio, por uma resposta imune anormal ao auto-antigénio ou por uma combinação de ambos. Algumas vezes os agentes exógenos provocam uma resposta imune, que inclui a sensibilidade a certos auto-antigénios (imitação de epítipo). Uma resposta imune elevada pelo hospedeiro contra um determinante específico de um agente infectante pode reagir cruzadamente com a sequência de hospedeiro imitada, conduzindo à auto-imunidade e à possível lesão e doença do tecido. Muitos epítipos compartilham proteínas bacterianas e virais com protef-



-3-

nas da célula hospedeira que são suficientemente similares para reagirem cruzadamente, contudo suficientemente diferentes para quebrarem a tolerância imunológica.

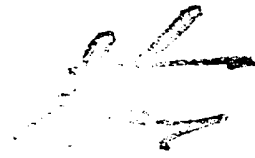
O reconhecimento dos auto-antigénios e/ou antigénios exógenos e do dano que ocorre subsequentemente do auto-antigénio contendo tecido pelo sistema imune é mediado pelos linfócitos T e linfócitos B.

Na patente US 4 634 590 é descrita a cultura de linfócitos T específicos, responsáveis por causarem doenças auto-imunes em animais de laboratório, como linhas de células a longo prazo. Verificou-se que após atenuação destes linfócitos T específicos, as células ou o seu material de membrana podem ser utilizadas como agentes efectivos para a vacinação contra uma doença auto-imune específica.

O WO 85/05034 descreve a utilização duma Micobacterium ou duma sua fracção numa composição ou vacina para alívio dos sintomas ou para o tratamento ou diagnóstico das doenças artríticas. São identificadas as fracções específicas de Micobacterium que mostram reactividade cruzada imunológica com proteoglicanos da cartilagem da articulação normal. A protecção contra a artrite adjuvante (AA) e a supressão da doença auto-imune podem ser associadas com uma fracção específica de Micobacterium, enquanto que a outra fracção induz a resposta auto-imune nociva.

Além disso foram identificados dois clones de linfócitos T respondendo às duas fracções de Micobacterium respectivamente, podendo assim ser associados com a artritogenicidade ou com a supressão da artrite.

Foram também utilizados clones de linfócitos T da artrite adjuvante para identificar o antigénio presente na Micobacterium reconhecida por estes clones de células T. Foi identificada uma proteína de 65 KD como o antigénio da Micobacterium que extrai a resposta proliferativa dos clones de células T in vitro. O epítopo reconhecido pelos clones de células T reside na sequência de aminoácidos 180-188 do antigénio de 65 KD. Esta sequência mostra uma semelhança com uma parte da proteína de ligação do proteogli-



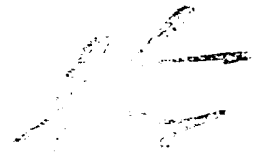
cano de ratazana (ver van Eden et al., Nature 331, 171, (1988)).

O tratamento terapêutico corrente das doenças auto-imunes inclui a administração de drogas não específicas que suprimem a resposta auto-imune mas também produzem várias complicações indesejáveis associadas com a depressão total do sistema imune ou causam outros efeitos laterais tóxicos não desejáveis nos tecidos não linfóides. Exemplos de drogas correntemente utilizadas que combatem as doenças auto-imunes são o naproxeno, auranofina, penicilamina, cloroquina e corticosteróides. Assim numa aproximação preferível para o tratamento ou profilaxia de uma doença auto-imune, as drogas têm de ser preparadas numa forma que afecte especificamente a reactividade imunológica conduzindo aos sintomas da doença.

É conhecido da literatura que o receptor da acetilcolina, sendo o auto-antigénio sob ataque na doença auto-imune miastenia grave, pode ser utilizado para a supressão da resposta imune específica contra o antigénio. O receptor da acetilcolina ligado às toxinas ricina ou gelonina é capaz de eliminar uma fracção dos linfócitos reactivos ao antigénio (Killen, J.A. e Lindstrom, J.M., Journal of Immunology 133 (1984), 2549-2553; Olsberg, C.A. et al., Journal of Immunology 135 (1985), 3062-3067; Brust, S. et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368 (1987), 991-999).

É além disso conhecido que um antigénio na maioria dos casos só pode ser reconhecido pelos linfócitos T após processamento do referido antigénio pelas células que apresentam antigénio (CAA) em combinação com moléculas do complexo de maior histocompatibilidade (CMH). Consequentemente, a aproximação antigénio-toxina da arte anterior notada acima tem a desvantagem de durante o processamento das CAA do conjugado antigénio-toxina as CAA se tornarem inactivas por acção da toxina, privando o sistema imune de células valiosas.

O presente invento reside no facto de que os epitopos auto-específicos ou epitopos exógenos estão a ser conjugados com uma substância citotóxica em vez do auto-antigénio inteiro ou antigénio exógeno, enganando a necessidade de processamento pelas CAA.



Além disso, na presente situação a substância citotóxica é agora ligada ao fragmento do antigénio que é directamente reconhecido pelo linfócito T: o epitopo. Isto resulta numa acção tóxica mais eficiente do conjugado de substância citotóxica-epitopo para os linfócitos que permite a utilização de concentração reduzida do referido conjugado de substância citotóxica-epitopo de forma a alcançar a completa eliminação dos linfócitos T auto-imunogénicos.

Além disso, no caso dos antigénios exógenos, no presente invento, só os linfócitos T responsáveis pela resposta auto-imune são eliminados permitindo ao sistema imune evocar uma resposta imune contra o antigénio exógeno.

A imunotoxina preparada de acordo com o presente invento é assim caracterizada por compreender um epitopo, reconhecido pelos linfócitos T sendo característico para a doença auto-imune específica ou um seu análogo reactivo cruzadamente sendo, o referido epitopo ou seu análogo reactivo cruzadamente acoplado a uma substância citotóxica.

Muitas proteínas e/ou epitopos que são reconhecidos pelos linfócitos T sendo características para a doença auto-imune específica são conhecidas e descritas na literatura.

A artrite adjuvante (AA) é uma doença auto-imune crónica que causa a degeneração da cartilagem nas articulações. A artrite adjuvante pode ser induzida em ratas por imunização com um antigénio de Micobacterium tuberculosis (Mt). O dano no tecido observado na AA é característico dos linfócitos T. Os linfócitos T são estimulados por um antigénio pertencente à Micobacterium tuberculosis que imita os auto-antigénios que estão sob ataque nas ratas artríticas.

Tem sido verificado que os clones de linfócitos T específicos são capazes de reconhecer quer o antigénio da Micobacterium tuberculosis estranho quer o auto-antigénio. O auto-antigénio reside provavelmente numa parte de uma molécula de proteoglicano da cartilagem, denominada a proteína de ligação. Estes clones de linfócitos T específicos reagem especificamente com uma proteína de



65 KD, uma proteína Mt expressada pela *E. coli* transfectada com ADN Mt. Esta proteína de 65 KD representa um papel importante na resposta imune às estirpes de Micobacterium.

Um péptido consistindo em 21 aminoácidos residindo na sequência de aminoácidos 65-85 da proteína de 65 KD assim como um péptido consistindo em nove aminoácidos, Thr-Phe-Gly-Leu-Gln-Leu-Glu-Leu-Thr, residindo na sequência de aminoácidos 180-188 da proteína de 65 KD são identificados como os epitopos que são reconhecidos pelos linfócitos T. O referido nonapéptido mostra uma semelhança com uma parte da proteína de ligação da molécula de proteoglicano que liga a proteína do núcleo ao suporte principal do açúcar desta molécula e tem a sequência de aminoácidos Thr-Ala-Val-Val-Ala-Leu-Glu-Leu-Gln. A proteína de 65 KD da Micobacterium bovis que tem uma região de codificação idêntica à da proteína de 65 KD da Mt contém também vários epitopos que são reconhecidos pelos linfócitos.

Estes epitopos dos linfócitos T coincidem ou residem nas sequências de aminoácidos 1-16, 17-61, 85-108, 112-132, 235-279 e 437-459 (para as sequências de aminoácidos da proteína de 65 KD da Micobacterium ver Thole et al., Infect. Immun. 55, 1466-1475, 1987; Husson et al., PNAS 84, 1679-1683, 1987; Shinnick et al., J. Bact. 169, 1080-1088, 1987).

A proteína básica de mielina (PB) é um auto-antígeno em espécies diferentes. A imunização com PB ou a transferência passiva de linfócitos dos animais imunizados com PB induz a doença auto-imune encefalomielite auto-imune experimental (EAE) em espécies variadas. A EAE causa a paralisia inflamatória e a desmielinação, sintomas que também ocorrem com a esclerose múltipla. A EAE é mediada por uma classe específica de linfócitos T. A imunização com PB ou alguns dos seus fragmentos induz a EAE em espécies susceptíveis, contudo nem todo o fragmento é encefalogénico. Os linfócitos T só são activados pela proteína intacta ou por fragmentos contendo um epitopo específico. São já bem conhecidos na arte epitopos variados na PB. As sequências de aminoácidos 1-16, 1-37, 59-74, 68-88, 89-169 e 114-122 da PB têm já sido iden

tificadas como epítopos ou sequências contendo epítipo, mostrando afinidade para os linfócitos T encefalogénicos e por isso para os linfócitos T característicos da esclerose múltipla (para as sequências de aminoácidos da proteína básica de mielina ver Eylar et al., J. Biol. Chem. 246, 5770, 1971; Gibson et al., J. Biol. Chem. 259, 5028, 1984; Stoner, G.L. J. Neurochem. 43, 433-447, 1984; Scoble et al., J. Neurochem. 47, 614-616, 1986).

A miastenia grave (MG), uma outra doença auto-imune, é iniciada pela apresentação de um factor imunogénico do receptor da acetilcolina resultando na estimulação dos linfócitos auto-imunes. A MG é caracterizada pelos auto-anticorpos e linfócitos T dirigidos contra o receptor da acetilcolina resultando na degradação aumentada do receptor e manifesta-se a si mesma clinicamente por fraqueza e fadiga dos músculos voluntários. O receptor da acetilcolina consiste em 5 subunidades ($\alpha 2\beta cd$).

A maior parte da resposta auto-imune celular dos pacientes sofrendo de MG está dirigida para uma área na subunidade- α do receptor: a região imunogénica principal. Nesta região têm sido identificados epítopos ou sequências de aminoácidos contendo epítipo variadas tais como as sequências de aminoácidos 1-30, 73-90, 100-116, 111-126, 146-162, 169-181, 182-198, 257-271, 351-368 (para as sequências de aminoácidos do receptor da acetilcolina ver Noda et al., Nature 299, 793-797, 1982 e Nature 302, 528-532, 1983 e Nature 305, 818-823, 1983; Sumikawa et al., Nucleic Acid Res. 10, 5809-5822, 1982; Devillers-Thiery et al., PNAS 80, 2067-2071, 1983; Hohlfeld et al., J. Clin. Invest. 81, 657-660, 1988).

O termo epítipo como aqui utilizado indica um determinante imunogénico de uma molécula imunogénica, sendo o determinante imunogénico reconhecido por um componente do sistema imune.

Os epítopos notados acima são candidatos para acoplamento a uma substância citotóxica resultando num conjugado de substância citotóxica-epítipo de acordo com o presente invento.

É óbvio para um pessoa perita na arte que o péptido contendo só uma parte de um epítipo mostrará também uma afinidade de



-8-

ligação para os linfócitos T como será o caso com um péptido contendo adicionalmente ao epítopo, aminoácidos de flaqueamento ou outros grupos. O comprimento destes grupos de flaqueamento está limitada pelo requisito de que o péptido não é necessariamente processado pelo CAA. É certo que uma imunotoxina compreendendo esses péptidos está também dentro do âmbito deste invento.

Além disso, é possível que os polipéptidos tendo uma sequência de aminoácidos similar mas não idêntica mostrem correspondentes características imunológicas. Os polipéptidos relacionados com um epítopo da forma notada acima são também incluídos no presente invento.

As substâncias citotóxicas a serem utilizadas na estrutura do presente invento são seleccionadas a partir de um grupo de substâncias que são capazes de parar a proliferação de células e causar eventualmente a morte da célula.

De preferência as substâncias citotóxicas são seleccionadas a partir de um grupo de proteínas originárias de plantas, fungos ou bactérias, tendo a propriedade de exibirem a síntese de proteínas em células eucarióticas. Estas toxinas actuam especificamente no processo de tradução pela inactivação cataliticamente dos ribossomas. As toxinas das plantas são classificadas em dois grupos i.e. toxinas compostas quer de duas quer de quatro subunidades contendo proteína e toxinas consistindo numa molécula de proteína de cadeia única à qual é normalmente ligado um grupo carbó-hidrato.

As toxinas de duas subunidades têm uma massa molecular de 60-65 KD, sendo a subunidade A ligeiramente mais pequena que a subunidade B (30 KD vs 32 KD). As subunidades estão covalentemente ligadas por uma ligação dissulfureto simples, mas são também importantes as interacções hidrofóbicas para manterem A e B juntas. A subunidade B consiste numa cadeia de polipéptido e numa cadeia de carbó-hidrato que contém manose e N-Ac-glucosamina. Esta subunidade parece estar envolvida na interacção da toxina com as glicoproteínas e lípidos contendo galactose da membrana de células alvo. Esta subunidade permite à subunidade A entrar na cé-

lula A subunidade A inactiva os ribossomas eucarióticos duma forma catalítica, com consequente inibição da síntese de proteínas e morte da célula. Incluídos neste grupo de toxinas estão a ricina, abrina, modicina, volquesina e viscumina.

As toxinas de plantas de cadeia única têm propriedades similares às das subunidades A descritas acima. Elas são inactivas sobre as células intactas embora sejam inibidores muito potentes em sistemas livres de células. Por causa da ausência de uma subunidade B estas toxinas entram com dificuldade nas células alvo, sendo assim muito menos tóxicas para as células do que as toxinas contendo subunidade B. Contudo, elas podem-se tornar tóxicas se forem ligadas a veículos capazes de ligação ou entrada nas células tais como lecetinas e anticorpos. As proteínas seguintes pertencem a esta classe de toxinas, p.e. gelonina, proteínas antivirais erva-dos-cancros, dodecandrina, diantinas, lufina, saporinas, inibidor da Momardica carantia, inibidores de cereais.

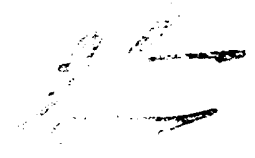
As toxinas de proteínas fúngicas, p.e.: α -Sarcina, restrictocina e mitogilina são proteínas básicas intimamente relacionadas. Estas toxinas contêm uma cadeia de polipéptido única e ao contrário da maioria das toxinas de plantas não contêm um grupo carbo-hidrato.

A toxina da difetéria e a exotoxina da *Pseudomonas* são dois exemplos de toxinas bacterianas que mostram similaridades funcionais com as toxinas de plantas de duas subunidades descritas acima.

Outras substâncias citotóxicas preferidas são seleccionadas a partir do grupo de rádio-isótopos. Estes rádio-isótopos podem ser alvejados para as células específicas. As células alvo são danificadas ou mortas pela utilização de isótopos que emitem partículas- α ou partículas- β energéticas. Os isótopos adequados são ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{43}Sc , ^{67}Cu , ^{186}Rh , ^{188}Rh , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{103}Pd .

Há um número bem conhecido de formas para conjugar um epítopo a uma toxina de proteína.

O acoplamento ao acaso entre o epítopo e uma toxina de



proteína pode por exemplo ser alcançado pela utilização de um composto de carbodiimida (p.e. EDC) que activa o grupo carboxilo de uma toxina de proteína de forma a que este seja acoplado ao grupo amino do epitopo.

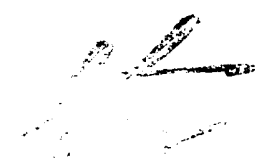
À parte deste acoplamento directo podem ser utilizados ligantes para proporcionar uma ponte entre o epitopo e uma toxina de proteína. Um agente de ligação cruzada homobifuncional bem conhecido é o glutar(di)aldeído. Ele reage de preferência com aminas.

Outros ligantes homobifuncionais podem ser seleccionados a partir do grupo de imido-ésteres (p.e. adipimidato de dimetilo, suberimidato de dimetilo) ou ésteres de N-hidroxisuccinimida (p.e. suborato de di-succinimidilo, ditiobis (succinimidil propionato), tendo ambos especificidade para grupos amina.

São preferidos os reagentes heterofuncionais uma vez que eles contêm dois grupos funcionais diferentes que permitem o controlo da reacção de conjugação quer selectivamente quer sequencialmente. Um exemplo de um ligante heterobifuncional é o N-succinimidil-3(2-piridilditio)propionato (SPDP). Primeiro é introduzido um grupo 2-piridil-dissulfureto no epitopo por reacção de uma amina primária com SPDP. O epitopo derivado pode agora ser conjugado com uma toxina de proteína contendo um grupo tiol, formando uma ligação dissulfureto entre o epitopo e a toxina de proteína. Se não estiver já presente este grupo tiol pode ser introduzido na toxina de proteína pelos agentes de tiolação tais como 2-imino tiolano, SPDP ou N-succinimidil-S-acetiltioacetato.

Os grupos maleimida assim como os grupos bromo- ou iodoacetilo reagem sob condições suaves razoavelmente rapidamente com grupos tiol para darem uma ligação do tipo tio-éter. O grupo maleimida pode, por exemplo, ser introduzido no epitopo por reacção de um grupo amino do epitopo com 4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato de succinimidilo. No segundo passo é ligado um grupo sulfidrilo contendo toxina de proteína com um epitopo activado com maleimida.

O grupo carbo-hidrato de uma toxina de proteína pode tam-



-11-

bém ser utilizado para ligação ao epítopo. O periodato é utilizado para gerar grupos aldeído no grupo carbo-hidrato. Subsequentemente os grupos aldeído são deixados reagir com grupos amino de epítopo para formarem uma base de Schiff que pode ser estabilizada por redução para dar uma amina secundária.

O acoplamento de rádio-isótopos aos epítopos é alcançado pela utilização dum quelante. Os quelantes são construídos numa forma tal que é assegurada a boa estabilidade in vivo do complexo isotopo-quelante.

Uma outra forma para a construção de imunotoxinas de acordo com o presente invento é a preparação através de técnicas de ADN recombinante. As sequências de ácido nucleico importantes derivadas do ADN genómico ou ARNm que codificam para os polipéptidos da toxina ou seus domínios tóxicos estão ligadas com sequências de nucleótidos transportadores de informação genética para a sequência de aminoácidos do epítopo. Opcionalmente pode ser incorporada uma sequência de ligação que codifica uma sequência de aminoácidos que é adequada como o separador entre a toxina e o epítopo. A produção destes imunotoxinas pode ser alcançada quer em sistemas de expressão procarióticos quer eucarióticos.

As imunotoxinas do presente invento podem ser administradas entericamente ou de preferência parentericamente. Para este fim elas são misturadas com um ou mais veículos usuais e/ou excipientes usuais não tóxicos farmacêuticamente aceitáveis, resultando numa composição farmacêutica.

A referida composição farmacêutica inclui comprimidos, pílulas e comprimidos revestidos para administração entérica e soluções, suspensões e emulsões para administração oral ou parentérica.

A dosagem dos compostos no preparado de acordo com o presente invento depende muito do requisito individual do paciente. Contudo, para injeção intravenosa os compostos são de preferência administrados numa dosagem inicial entre 0,1 μ g e 1 mg por kg de peso corporal, seguida se necessário, por uma ou mais dosagens suplementares por dia. Para infusão os compostos são administra-

-12-

dos durante um período de tempo prolongado a uma dosagem que é baseada na administração intravenosa notada acima.

O presente invento é posteriormente ilustrado por meio dos exemplos seguintes.

Exemplo 1

Síntese do nonapéptido Thr-Ala-Val-Val-Ala-Leu-Glu-Leu-Gln-OH (I)

A síntese do nonapéptido com a fórmula I é realizada pelo processo de síntese de péptido de fase sólida, como originalmente descrito por Marrifield (J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149, 1963).

A síntese é realizada num aparelho Vega Coupler 250 C, utilizando uma resina de álcool p-benziloxibenzílico (0,6-0,7 mmol/g, Bachem A.C., Suíça).

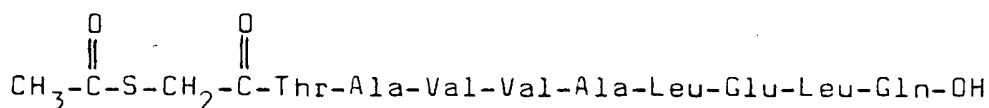
Os aminoácidos são acoplados à resina numa maneira a passo e passo como os seus N^α-Fmoc-(Fmoc=9-fluorenilmetiloxicarbonil-) derivados, enquanto que as funções da cadeia lateral de Glu e Thr são protegidas com um t-butiléster e um t-butiléter, respectivamente.

A síntese começa pelo acoplamento de Fmoc-Gln-OH à resina, utilizando DCC (diciclo-hexilcarbodiimida) e DMAP (N,N-dimetilaminopiridina) a baixa temperatura e na presença de HOBt (N-hidroxibenzotriazol), como descrito por Van Nispen et al. (Recl. Trav. Chim. Pays-Bas 104, 99-100, 1985). Os grupos álcool livres de resíduos na Fmoc-Gln-resina resultante (0,3-0,4 mmol/g) são bloqueados por meio de acetilação.

O Fmoc-grupo protector é removido por tratamento da resina com piperidina a 25% em DMF (dimetilformamida) durante 10 minutos, seguido por 3 lavagens (de um minuto cada) com DMF e CH₂Cl₂.

São sucessivamente acoplados Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH (2 vezes), Fmoc-Ala-OH e Fmoc-Thr(tBu)-OH utilizando 3 equivalentes cada do aminoácido protegido, DCC e HOBt em 6-7 ml de DMF por grama de resina durante 2 horas. Depois são realizadas 3 lavagens de um minuto cada com etanol, DMF e CH₂Cl₂. A perfeição de cada acilação é contro-

propilamina. É então adicionada uma solução de 1,2 equivalentes de N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) em DMF. O pH da mistura reaccional é mantido a 7,5-8,0 por adição da base terciária referida. Após 30 minutos à temperatura ambiente o pH da solução é baixado para 5,0 por adição de ácido acético. A seguir à remoção dos solventes por evaporação in vacuo, o resíduo é triturado com acetato de etilo-éter. O derivado do péptido III é subsequentemente dissolvido em t-butanol-água (1:1; v/v) e isolado por liofilização.



III

B. Derivado maleimida

A acilação do grupo N^α-amino em I, utilizando o procedimento descrito no exemplo 2A, com N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclo-hexano-1-carboxilato (SMCC, "Pierce") proporciona o derivado maleimida IV.

C. Derivado bromoacetilo

A acilação do grupo N^α-amino em I, utilizando o procedimento descrito no exemplo 2A, com N-succinimidilbromoacetato, proporciona o derivado bromoacetilo V.

D. Derivado dissulfureto de piridilo

A acilação do grupo N^α-amino em I, utilizando o procedimento descrito no exemplo 2A, com N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP, "Pierce"), proporciona o derivado dissulfureto de piridilo VI.

Exemplo 3

Síntese de derivados da gelonina

A. Derivado iminotiolano

Os grupos SH livres são introduzidos na gelonina por derivatização da toxina com 2-iminotiolano (reagente de Trauts).



-15-

É adicionado um excesso molar 50 vezes maior de 2-iminotiolano (2-iminotiolano a 0,4 M em tampão de fosfato a 0,1 M pH 8,0, contendo EDTA a 1 mM; concentração final do 2-iminotiolano é de 5 mmol/l) a 4 ml de solução de gelonina (3 mg/ml; 100 μ mol/l) no tampão notado acima. A mistura reaccional é incubada durante 30 minutos a 30°C. Subsequentemente a mistura é aplicada a uma coluna de Sephadex G25, equilibrada com tampão de fosfato a 0,1 M, pH 7,5, NaCl a 0,1 M, EDTA a 1 mM, para remover o excesso de reagente e produtos reaccionais de baixo peso molecular. O rendimento deste passo de derivatização foi de 92% e a toxina continua uma média de 1-2 grupos SH por molécula de gelonina.

B. Derivado dissulfureto de piridilo

Os grupos dissulfureto de piridilo (PDP) são introduzidos na gelonina por dissolução da gelonina num tampão de fosfato a 0,1 M pH 7,5, NaCl a 0,1 M, EDTA a 1 mM (3 g de gelonina/l). É adicionado um excesso molar 5 vezes maior de succinimidilpiridil-ditiopropionato (SPDP a 40 mM em etanol; a concentração final de SPDP é de 500 μ mol/l) a 4 ml de solução de gelonina (3 g de gelonina/l) em tampão de fosfato a 0,1 M pH 7,5, NaCl a 0,1 M, EDTA a 1 mM e incubados 30 minutos à temperatura ambiente. Subsequentemente a mistura é aplicada a uma coluna de Sephadex G25, equilibrada no tampão notado acima para remover o excesso de reagente e os produtos reaccionais de baixo peso molecular. O rendimento da toxina foi de 95% e as moléculas de toxina continham uma média de 1-2 grupos dissulfureto de piridilo por molécula de gelonina.

Exemplo 4

Ligação do derivado do nonapéptido ao derivado da gelonina

A. Ligação do nonapéptido IV ao derivado iminotiolano da gelonina

8 ml de solução de derivado de gelonina (1,4 mg/ml) são incubados à temperatura ambiente com um excesso molar 2,5 vezes maior de nonapéptido IV (concentração final 115 μ mol/l) durante 2 horas. O tampão de incubação é um tampão de fosfato pH 7,5, NaCl a 0,1 M, EDTA a 1 mM. Subsequentemente a mistura reaccional é aplicada a uma coluna de Sephadex G50, equilibrada com tampão de

incubação para remover o excesso de reagente e produtos reaccionais de baixo peso molecular. O derivado da gelonina a 72% é convertido no conjugado como testado por SDS-PAGE, contendo o componente principal uma molécula de gelonina por péptido.

A gelonina livre é removida por cromatografia de permuta iónica em Mono Q (tampão-Tris a 0,05 M, pH 8,0). O conjugado é eluído com NaCl a 0,5 M.

B. Ligação do nonapéptido VI ao derivado iminotiolano da gelonina

A preparação do conjugado notado acima é realizada utilizando o procedimento descrito sob A.

C. Ligação do nonapéptido V ao derivado dissulfureto de piridilo da gelonina

A preparação do conjugado notado acima é realizada utilizando o procedimento descrito sob A.

Exemplo 5

Ligação do nonapéptido III ao derivado dissulfureto de piridilo da gelonina

0,5 ml de derivado da gelonina (1,4 mg/ml) são incubados durante a noite a temperatura ambiente com um excesso molar 2,5 vezes maior de nonapéptido III (concentração final de 115 μ mol/l) no tampão de fosfato notado acima ao qual é adicionada hidroxilamina (10 mM).

Após estar completa a reacção a mistura é aplicada a uma coluna de Sephadex G50, equilibrada em tampão de incubação para remover o excesso de reagente e produtos reaccionais de baixo peso molecular. O derivado da gelonina a 67% é convertido no conjugado como testado por SDS-PAGE. A gelonina livre é removida por cromatografia de permuta iónica em Mono Q (tampão-Tris a 0,05 M, pH 8,0). O conjugado é eluído com NaCl a 0,5 M.

Exemplo 6

Ligação de um epitopo (RdV₁) consistindo em 20 aminoácidos da sequência de aminoácidos 65-85 da proteína de 65 kD da *Micobacterium*

tuberculosis (MT) à Ricina-A

O péptido com a sequência Lys-Thr-Ile-Ala-Tyr-Asp-Glu-Glu-Ala-Arg-Arg-Gly-Leu-Glu-Arg-Gly-Ala-Val-Arg-Asn-Ala-Lys é diluído em DMF/H₂O (1:2). É adicionado SPDP a 0,4 M em DMF (relação molar 1:1) e a mistura é incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após incubação são adicionados dois volumes de acetato de etilo e a mistura é centrifugada durante 5 min numa centrífuga "eppendorf" à velocidade máxima. O precipitado é lavado com éter e centrifugado outra vez durante 5 min à velocidade máxima. O precipitado é então seco sob gás de azoto.

O precipitado seco é dissolvido em NaP a 0,1 M (pH = 7,3) num volume tão pequeno quanto possível.

A ricina-A (em NaP a 0,1 M pH = 7,3) é reduzida por adição de DTT a 1 M para uma concentração de 10 mM e incubação da mistura durante 30 min à temperatura ambiente. A solução é então des-salinizada sobre PD 10 em NaP a 0,1 M (pH = 7,3).

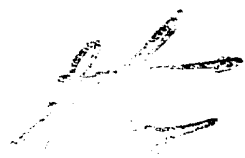
A ricina-A reduzida é adicionada ao péptido tratado com SPDP numa relação molar de 1:5. A mistura é incubada à temperatura ambiente durante 1 hr.

A solução conjugada resultante pode ser armazenada a 4°C. Se necessário, as impurezas com elevado peso molecular podem ser removidas cromatograficamente (Fractogel HW 55 (s) em PBS).

Exemplo 6B

Um clone de células T humanas de um paciente AR é estimulado com o antigénio específico da proteína de 65 kD na presença de Células Apresentando Antigénio (CAA). São adicionadas concentrações variadas de ricina-A, Ricina-A de 65 kD ou RdV₁-ricina-A. Passados três dias a proliferação das células é medida através da incorporação de H³-timidina. Os resultados são representados abaixo como percentagens da incorporação nas culturas estimuladas sem adição de toxina (conjugados).

a e b são uma primeira e uma segunda experiência respectivamente.



$\mu\text{g}/\text{ml}$ de toxina		% de incorpora _ç ão de Ricina A		% de incorpora _ç ão de Ricina A de 65 kD		% de incorpora _ç ão de Ricina-A-RdV ₁
a	b	a	b	a	b	a
0	(0)	100	(100)	100	(100)	100
0,1	(0,02)	71	(96)	45	(86)	30
0,3	(0,2)	90	(64)	32	(78)	26
1,0	(2,0)	80	(22)	47	(76)	24
3,0	(20,0)	24	(6)	31	(59)	17
10,0		11		44		18
30,0		7		19		7

Os valores de LD₅₀ para as experiências acima mostradas são

	Ricina-A	Ricina-A de 65 kD	RdV ₁ -Ricina-A
LD ₅₀	1,1	33	<0,1

Por consequência podemos concluir que o conjugado de epítopo-Ricina-A é mais tóxico para estas células que a toxina sozinha ou que o conjugado de toxina de 65 kD.

Exemplo 6C

São repetidas as mesmas experiências como no exemplo 6B com a condição de que não estão presentes células apresentando antígeno e que as células T são estimuladas com IL-2 (antígeno não específico). Os resultados são mostrados abaixo.



$\mu\text{g/ml}$ de toxina	Ricina-A		Ricina-A de 65 kD		Ricina-A-RdV ₁
	a	b	a	b	a
0 (0)	100	(100)	100	(100)	100
0,1 (0,02)	105	(100)	96	(107)	93
0,3 (0,2)	92	(93)	89	(90)	90
1,0 (2,0)	85	(80)	73	(81)	75
3,0 (20,0)	82	(1)	31	(17)	27
10,0	47		17		25
30,0	4		1		2

A média dos valores de LD₅₀ são:

	toxina	toxina de 65 kD	toxina-RdV ₁
LD ₅₀ médio	6,8	3,9	1,7

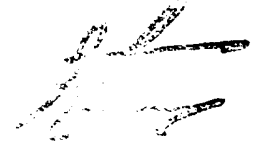
Pode ser concluído que os conjugados de RdV₁-Ricina-A são os mais efectivos na inibição da proliferação deste clone de células T.

Exemplo 7

Em ratas de Lewis machos é induzida a artrite adjuvante pela Micobacterium butiricum (100 mg/ml em querosene).

Cada 6 grupos de 5 ratas são tratados aos dias 0-5 e aos dias 8-12 com injeções do seguinte:

- grupo 1 placebo
- grupo 2 conjugado de Ricina-A de 65 kD (ver exemplo 6) (1 mg/kg)
- grupo 3 conjugado de péptido I-Ricina-A (ver exemplo 5) (0,25 mg/kg)
- grupo 4 Ricina-A (0,25 mg/kg)
- grupo 5 proteína de 65 kD (0,5 mg/kg)
- grupo 6 péptido I (0,01 mg/kg)



-20-

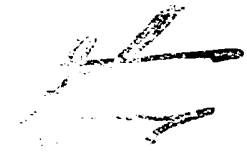
No dia 22 são injectados 10 μ g de protefina de 65 kD no ouvido.

No dia 24 é determinada a tumefacção do ouvido.

Os resultados médios são calculados por grupo e representados como percentagens de tumefacção.

grupo	% de tumefacção
(1)	5,0 \pm 2,6
(2)	8,1 \pm 2,8
(3)	-0,2 \pm 2,5
(4)	8,1 \pm 3,0
(5)	5,8 \pm 2,9
(6)	2,8 \pm 3,4

Pode ser concluído que o conjugado de nonapéptido-Ricina exhibe o DTH contra a protefina de 65 kD em ratazanas.



R E I V I N D I C A Ç Õ E S

1 - Processo de preparação de uma imunotoxina para o tratamento ou profilaxia de uma doença auto-imune, compreendendo a imunotoxina um epítipo, reconhecido pelos linfócitos T, sendo característico para a doença auto-imune específica ou um seu análogo reactivo cruzadamente, caracterizado por o referido epítipo ou o seu análogo reactivo cruzadamente ser acoplado a uma substância citotóxica quer directamente quer por meio de um ligante.

2 - Processo de preparação de uma imunotoxina para o tratamento ou profilaxia da artrite reumatóide de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o epítipo residir na proteína da cartilagem da articulação.

3 - Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por o epítipo ter a sequência de aminoácidos Thr-Ala-Val-Val-Ala-Leu-Glu-Leu-Gln.

4 - Processo de preparação de uma imunotoxina para o tratamento ou profilaxia da artrite reumatóide de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o epítipo residir na proteína de 65 KD de Mycobacterium.

5 - Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por o epítipo ter a sequência de aminoácidos Thr-Phe-Gly-Leu-Gln-Leu-Glu-Leu-Thr.

6 - Processo de preparação de uma imunotoxina para o tratamento ou profilaxia da esclerose múltipla de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o epítipo residir na proteína básica de mielina.

7 - Processo de preparação de uma imunotoxina para o tratamento ou profilaxia da miastenia grave de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o epítipo residir no receptor da acetilcolina.

8 - Processo de acordo com as reivindicações 1-7, caracterizado por a substância citotóxica ser uma proteína inactivante do ribossoma.

9 - Processo de acordo com as reivindicações 1-7, caracterizado por a substância citotóxica ser um radio-isótopo.

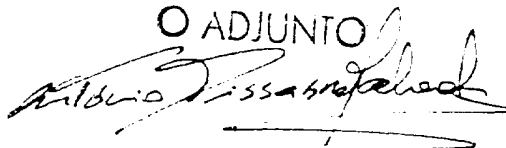
10 - Processo de preparação de um preparado farmacêutico, caracterizado por se associar, como componentes biologicamente activos, uma ou mais imunotoxinas preparadas de acordo com as reivindicações 1-9, com veículos ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis.

Lisboa, 20.OCT.1989

Por AKZO N.V.

- O AGENTE OFICIAL -

O ADJUNTO



António Passalunghi
