

(11) Número de Publicação: **PT 1107789 E**

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/395 (2007.10) **A61K 38/02** (2007.10)

C07K 16/18 (2007.10) **C12N 1/21** (2007.10)

C12N 15/85 (2007.10) **C12Q 1/68** (2007.10)

A61P 37/06 (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **1999.08.24**

(30) Prioridade(s): **1998.08.24 US 97640 P**
1999.08.24 US 382088 P

(43) Data de publicação do pedido: **2001.06.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.06.25**
197/2008

(73) Titular(es):

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY
900 WELCH ROAD, SUITE 350 PALO ALTO, CA
94304-1850 US**

(72) Inventor(es):

ERNEST G. HOPE US
ROBERT NEGRIN US

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PROTEGER ÓRGÃOS, TECIDOS E CÉLULAS
DE DANOS MEDIADOS PELO SISTEMA IMUNITÁRIO**

(57) Resumo:

RESUMO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PROTEGER ÓRGÃOS, TECIDOS E CÉLULAS DE DANOS MEDIADOS PELO SISTEMA IMUNITÁRIO"

Esta invenção refere-se a novas composições e métodos para a protecção de órgãos e células de danos provocados por linfocitos activadores de células NK e tipos de células NK, mais particularmente, composições e métodos para a protecção de células endoteliais vasculares dos danos mediados pelo sistema imune.

DESCRIÇÃO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PROTEGER ÓRGÃOS, TECIDOS E CÉLULAS DE DANOS MEDIADOS PELO SISTEMA IMUNITÁRIO"

CAMPO DA INVENÇÃO

O campo da invenção são composições e métodos para a protecção de tecidos, órgãos e células de danos mediados pelo sistema imunitário.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O transplante de medula óssea (BMT) representa uma das formas de terapia curativa para doentes com doenças malignas. Os efeitos benéficos do BMT não são apenas devidos às elevadas doses da quimioterapia e radioterapia, mas também a mecanismos imunitários denominados "efeito GvL - enxerto *versus* leucemia" (Sullivan *et al.*, *Blood* 73:1720 (1989); Weiden *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 300:1068-1073 (1979)). Tanto as células NK assassinas naturais e os subconjuntos de células T contribuem para o GvL (Antin, *Blood* 82:2273-2277 (1993); Hauch *et al.*, *Blood* 75:2250-2262 (1990)). Isto baseia-se na observação de que a remoção de linfócitos T do produto de células estaminais resulta em taxas de reincidência drasticamente elevadas no segmento de BMT alogénico (Martin *et al.*, *Blood* 66:664-672 (1985)). Foi também recentemente demonstrado que a

perfusão de linfócitos do dador em doentes que tiveram uma recaída após um transplante de BM alogénico com carência de células T resulta numa percentagem significativa de doentes com nova remissão completa (Collins *et al.*, *Clinical Oncology* 15:433-444 (1997); Kolb *et al.*, *Blood* 86:2041-2050 (1995); Porter *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 330:100-106 (1994)). A identificação e a expansão *in vitro* de subconjuntos de células NK e células T com uma actividade anti-tumoral espontânea ou adquirida de GvL é um campo activo de investigação.

A compreensão da biologia de linfócitos T citotóxicos clássicos (CTL) e sua utilização de TCR α/β , CD3 e CD8 no contexto da expressão MHC I apropriada em células alvo é avançada (Guidos *et al.*, *J. of Exp. Med.* 172:835-845 (1990); Weissman, *Cell* 76:207-218 (1994)). Contudo, a biologia dos subconjuntos mais raros de células T citotóxicas e de células NK que não utilizam as moléculas acima no sentido da citotoxicidade restrita do MHC I clássico continua a ser um desafio. Por exemplo, o campo da imunologia tumoral é alcançado pela verificação coerente de actividade citotóxica das células T pouco ortodoxa e expansão no contexto de auto e alo-reactividade de alvos tumorais que carecem de características clássicas de restrição de MHC I (Hoglund *et al.*, *Immun. Rev.* 155:11-28 (1997)). Várias populações distintas de células T e NK foram expandidas *in vitro* e utilizadas *in vivo* como células efectoras para uma imunoterapia adoptiva.

Os linfócitos activados assassinos LAK são produtos de cultura dependentes de IL-2, de curto prazo, com limitado potencial proliferativo derivado, das células NK. As células LAK reconhecem

uma vasta gama de alvos em células tumorais e células tumorais autólogas *in vitro*; contudo, a sua eficácia *in vivo* é limitada pelo requisito da co-aplicação de IL-2 (Blaise *et al.*, *Eur. Cytokine Netw.* 2:121-129 (1991); Fortis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother* 33:128-132 (1991); Lee *et al.*, *J. Biol. Response Mod.* 7:43-53 (1988); Nalesnik *et al.*, *Transplantation* 63:1200-1205 (1997); Rosenberg, *J. Biol. Response Mod.* 3:501-511 (1984); Rosenberg *et al.*, *New England J. of Med.* 316:889-897 (1987); Rosenberg *et al.*, *J. of Exp. Med.* 161:1169-1188 (1985); Teichmann *et al.*, *Leuk Res.* 16:287-98 (1992)). A administração sistémica de IL-2 é associada a toxicidades consideráveis que são caracterizadas pela destruição endotelial, *in vitro* e *in vivo* (Siegel *et al.*, *J. of Clin. Oncology* 9:694-704 (1991)). A terapia com células LAK levou a uma morbilidade significativa e mesmo mortes associadas à síndrome de fuga vascular (VLS) (Glauser *et al.*, *Am. J. Med. Sci.* 296:406-412 (1988); Kotasek *et al.*, *Cancer Res.* 48:5528-5532 (1988); Kozeny *et al.*, *J. Clin. Oncology* 6:1170-1176 (1988); Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210:474-484).

Os linfócitos infiltrantes do tumor (TIL) requerem isolamento de uma amostra cirúrgica. Apresentam geralmente uma elevada selectividade para o seu tumor respectivo. Todavia, a sua produção tende a ser volumosa e associada a fracos rendimentos. Os antígenos tumorais específicos estão raramente disponíveis para garantir uma expansão *in vitro* suficiente para tratamentos sucessivos e para progressão de doses (Rosenberg *et al.*, *New Engl. J. of Med.* 319:1676-1680 (1988); Rosenberg *et al.*, *J. Nat. Canc. Inst.* 86:1159-1166 (1994)).

As Células Assassinas Induzidas por Citocina CIK são produzidas na ausência de células alvo a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) através da cultura *in vitro* na presença de IFN- γ , OKT-3 e IL-2. Os linfócitos CIK registam uma actividade GvL *in vivo* superior, em comparação com LAK e são capazes de depurar ratinhos SCID de massa de tumor hematopoiética letal (Lu *et al.* *J. Immunol.* 153:1687-1696 (1994); Schmidt-Wolf *et al.*, *Ann. Hematol.* 74:51-56 (1997); Schmidt-Wolf *et al.*, *Exp. Hematol.* 21:1673-1679 (1993)). Tal como outras formas de células NK ou T activadas, as células CIK cultivadas em grande volume apresentam alguma citotoxicidade não desejada em relação ao endotélio cultivado (EC) *in vitro*.

A síndrome de fuga vascular (VLS) é um efeito secundário significativo associado à imunoterapia adoptiva para o tratamento de doenças como cancro. Em particular foi relatado que a utilização de IL-2 e das várias formas de células NK e T activadas por IL-2 podem levar a uma toxicidade considerável, incluindo VLS. No entanto, não foi relatado qualquer agente capaz de inibir a lise de células endoteliais através de células NK e T, restritos de MHC de classe I activados não clássicos (Blaheta *et al.*, *Immunology* 94:213-220 (1998); Finnegan *et al.*, *Cancer* 82:186-199 (1998); Utoguchi *et al.*, *Inflammation* 21:223-233 (1997)).

Os danos vasculares provocados pelo sistema imunitário são uma manifestação de uma activação global do sistema imunitário. Embora a activação da resposta imunitária seja extremamente importante para a saúde e o bom funcionamento de um hospedeiro, existem várias situações onde tal activação é indesejável. Um campo particular

está associado ao transplante, em que raramente se encontra uma correspondência idêntica entre o dador e o receptor dos antígenos de MHC. Outra situação clínica é a doença auto-imune. As células CTL atacam células em que o MHC e o péptido associado são ambos endógenos, como ocorre em doenças como a diabetes do tipo I (insulinodependente). Outros eventos indesejáveis de activação do sistema imunitário estão associados a doenças como choque séptico, artrite reumatóide, doença de Crohn, doença inflamatória intestinal, asma, reacção enxerto versus hospedeiro, doença das artérias coronárias e outras cardiomiopatias, síndrome de insuficiência respiratória do adulto, cirrose hepática viral e semelhantes.

A imunossupressão tornou-se uma abordagem geral em situações onde a inibição da activação de células CTL, NK e outros tipos é desejada. Contudo, imunossupressores, tais como corticosteróides, ciclosporina A, FK506 e semelhantes têm numerosos efeitos secundários indesejáveis, incluindo, por exemplo, um efeito imunossupressor geral sobre todo o sistema imunitário do hospedeiro. Existe, portanto, um interesse substancial em identificar novas substâncias que possam proteger especificamente os tecidos de danos provocados por células, tais como linfócitos T e outras células do tipo NK, particularmente os CTL, enquanto se obtém um menor efeito imunossupressor universal sobre o sistema imunitário e menos efeitos secundários, de forma a deixar o hospedeiro com uma proporção substancial do sistema imunitário para protecção de infecções adventícias. Métodos e composições para obter essa imunossupressão específica são aqui fornecidos.

BIBLIOGRAFIA RELEVANTE

Hoppe e Negrin, *Blood*, American Society of Hematology, Thirty-Ninth Annual Meeting, 5-9 Dezembro (1997), abstract no. 2019, Jiang *et al.*, *Immunology* 87(3):481-486 (1996); Wada *et al.*, *Jpn J. Cancer Res.* 84(8):906-913 (1993) e Krensky *et al.*, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 5:809 (1996).; Wada *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 84(8):906-913 (1993); Krensky *et al.*, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 5:809 (1996); documento XP-00 227 8849 Kureha Chemicals, 1994 e documento JP 07233083 A (KUREHA CHEM IND CO LTD), 5 de Setembro de 1995, abstract; documento WO 95/21614; Satoh *et al.*, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 133, No. 2, 469-483 (Abril 1996); Verrico *et al.*, *British Journal of Cancer* 76(6):719-724 (1997) e documento EP 0813871.

O resumo do documento de Hoppe *et al.*, 1997, refere-se ao tratamento de HUVEC com Brefeldina A que as torna resistentes contra CIK CTL CD3+ 16- 56+ e células NK activadas por IL-2. Além disso, este resumo relata que o HuHsp47 recombinante clonado protege HUVEC anteriormente sensíveis a citotoxicidade de eliminação não restrita de MHC I por CIK CTL CD3+ 56+. As células testadas não fazem parte do sistema imunitário activo e não permitem qualquer conclusão em relação à prevenção ou tratamento de danos em células mediados pelo sistema imunitário.

Satoh, 1996, aborda a localização onde o Hsp47 se associa e dissocia das cadeias pró-colagénio em fibroblastos de embriões de Pintos e, além disso, sustenta que a função do Hsp47 permanece aberta (página 482, último parágrafo). Não são divulgadas neste

documento quaisquer composições para a prevenção ou tratamento de doenças relacionadas com danos em células, tecidos ou órgãos mediados pelo sistema imunitário.

Verrico *et al.*, 1996, aborda a expressão de Hsp47 em fibroblastos da pele de murinos após lesões fotodinâmicas e não dá qualquer indicação da sua possível função no sistema imunitário humano.

O documento EP 0813871 aborda a inibição da produção de Hsp47 por derivados de berberina, de modo a tratar doenças de produção excessiva de colagénio. Não aborda o sistema imunitário humano.

O documento XP-002278849 da Kureha Chemicals, 1994, aborda o aumento da síntese de colagénio em osteoblastos de ratos e não fornece qualquer base para testes do Hsp47 em relação ao sistema imunitário humano.

O documento WO 95/21614 publicado em 1995, fornece compostos estruturalmente relacionados com a brefeldina, mas não fornece indicações de qualquer utilização na regulação por aumento do Hsp47 para prevenir danos mediados pelo sistema imunitário.

RESUMO DA INVENÇÃO

É aqui fornecida uma composição farmacêutica compreendendo polipéptido HuHSp47, composições e métodos para proteger as células, órgãos e outros tecidos, tais como células endoteliais vasculares, de danos provocados por linfócitos, células NK e células do tipo NK. Estas composições são utilizadas por si só ou associadas a outros agentes imunossupressores ou outros compostos terapêuticos como uma terapia combinada. As composições em epígrafe podem entrar em contacto *ex vivo* com células, tecidos ou um órgão. Em determinadas formas de realização, o material então tratado é transplantado para um recipiente. As composições em epígrafe podem também ser introduzidas *in vivo* por qualquer meio conveniente, em quantidade suficiente para proteger, substancialmente, células, órgãos e/ou outros tecidos de danos mediados pelo sistema imunitário. As composições em epígrafe são, de um modo preferido polipéptidos imunoprotectores relacionados com HuHsp47 ou ácidos nucleicos que codificam tais polipéptidos.

Numa forma de realização preferida, células, tecidos ou órgãos são colocados em contacto com uma quantidade imunoprotectora de um polipéptido imunoprotector relacionado com HuHsp47. Exemplos de estados de doença que provocam os danos mediados pelo sistema imunitário incluem várias doenças autoimunes, reacção enxerto *versus* hospedeiro e doença hospedeiro *vs* enxerto.

A invenção também inclui moléculas quiméricas de polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47 e as suas formas marcadas. São também divulgados métodos para imunoterapia adoptiva, da qual

em que conjunto alargado de linfócitos T é devolvido a um doente com uma quantidade imunoprotectora de brefeldina ou um polipéptido imunoprotector relacionado com HuHsp47.

São também divulgados métodos para identificar células que se ligam a polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47.

BREVE DESCRIÇÃO DOS ESQUEMAS

A Figura 1 apresenta a sequência de nucleótidos e correspondente sequência de aminoácidos do ADNc e proteína de Hsp47 humano, respectivamente.

A Figura 2 divulga as sequências relacionadas entre Hsp47, antígenos HLA-A e IL-12, bem como sequências de consenso.

As Figuras 3A, 3B e 3C demonstram a lise mediada por linfócitos CIK de alvos tumorais e células endoteliais (EC).

A Figura 4 demonstra a lise de tumores por linfócitos CIK e a lise de células endoteliais como uma função de concentração de brefeldina A (BFA).

As Figuras 5A, 5B e 5C apresentam a detecção imunológica da indução de Hsp47 em extractos de células endoteliais BFA não tratadas de 3 µg/mL e tratadas de 10 µg/mL.

As Figuras 6A e 6B apresentam uma purificação por cromatografia líquida rápida de proteínas de p46 a partir de extractos de células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) induzidas por BFA.

A Figura 7 apresenta os resultados de um ensaio de protecção HUVEC-CIK com Hsp47 nativo purificado (p46.5).

As Figuras 8A e 8B apresentam a clonagem de uma cassete de genes huHsp47 através de introdução direccionada para PCR de locais de clonagem e separação electroforética de produtos de expressão.

A Figura 9 ilustra que o rHsp47 fornecido externamente protege as HUVEC da lise mediada por linfócitos CIK.

A Figura 10 apresenta uma análise de Northern que confirma a regulação por aumento de ARNm de Hsp47 por tratamento com BFA.

A Figura 11 demonstra que a expressão recombinante de huHsp47 torna as HUVEC resistentes à lise mediada por linfócitos CIK.

A Figura 12 demonstra que o péptido "AVLSAEQLR" que é partilhado pelo Hsp47 e pelo HLA-A2*201 protege células endoteliais de cordão umbilical humano da lise mediada por linfócitos CIK.

A Figura 13 demonstra a protecção contra a doença enxerto *vs.* hospedeiro através de Hsp47 recombinante em combinação com transplante de medula óssea.

As Figuras 14A e 14B demonstram a indução de Hsp47 e outras proteínas por BFA.

As Figuras 15A, 15B e 15C representam os domínios estruturais de Hsp47, truncagem do terminal C de vários domínios e o seu efeito sobre a lise de EC.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

São fornecidos métodos e a composição para a protecção de células, órgãos e tecidos, como células endoteliais vasculares, de danos mediados pelo sistema imunitário provocados por linfócitos activados, NK e outras células do tipo NK. Os métodos e composições são utilizados para o tratamento de uma variedade de indicações adversas que são mediadas por células activadas do sistema imunitário incluindo, por exemplo, choque séptico, escleroderma, artrite reumatóide, doença de Crohn, doença inflamatória intestinal, colite, asma, reacção enxerto *versus* hospedeiro, doença das artérias coronárias e outras cardiomiopatias, síndrome de insuficiência respiratória do adulto e cirrose hepática viral e semelhantes.

As composições imunoprotectoras da presente invenção compreendem polipéptidos imunoprotectores relacionados com HuHsp47.

Conforme aqui utilizado, o termo “polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47” refere-se a qualquer polipéptido que tenha propriedades imunoprotectoras semelhantes às do polipéptido Hsp47 como aqui definido. Por exemplo, demonstrou-se que o polipéptido Hsp47 humano protege as células endoteliais de lise das células CIK. Um polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47 seria um tal que partilhe tanto em termos qualitativos ou quantitativos esta ou outras propriedades imunoprotectoras do Hsp47 humano.

Num aspecto da invenção, o polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47 é caracterizado além disso por um motivo de sequência de aminoácidos que corresponde à sequência global de consenso conforme estabelecido na Figura 1. Isto pode ser representado como $AX_1X_2X_3AX_4X_5X_6R$. Numa forma de realização preferida, X_1 é V, L, A ou T, X_2 é L ou H, X_3 é S ou V, X_4 é D ou E, X_5 é Q, K ou R, e X_6 é L ou V. Isto pode ser alternativamente representado como $A(v,l,a,t)(l,h)(s,v)A(d,e)(k,q,r)(l,v)R$.

Um polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47 pode também compreender uma sequência de consenso IL-12, tal como demonstrado na Figura 2. Isto pode ser representado como $AX_1LSAEX_5X_6R$, em que X_1 é de um modo preferido V, L ou T, X_5 é de um modo preferido Q, K ou R e X_6 é L ou V. Este aspecto da invenção pode também ser representado como $A(v,l,t)LSAE(q,k,r)(l,v)R$.

Ainda noutro aspecto da invenção, o polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47 compreende a sequência de consenso conforme estabelecido para HLA-A como demonstrado na Figura 1. Isto pode ser

representado como AX₁X₂X₃AEQLR. Nesta forma de realização, X₁ é de um modo preferido V ou A, X₂ é de um modo preferido L ou H, X₃ é de um modo preferido S ou V. Este aspecto da invenção pode também ser representado como A(v,a)(l,h)(s,v)AEQLR.

Num aspecto particularmente preferido da invenção, o polipéptido relacionado com Hsp47 inclui a sequência de consenso para Hsp conforme estabelecido na Figura 2. Isto pode ser representado como AVLSAX₄X₅LR. Nesta forma de realização, X₄ é de um modo preferido D ou E e X₅ é de um modo preferido K ou Q. Este aspecto da invenção pode igualmente ser representado como AVLSA(d,e)(k,q)LR.

Ainda noutra forma de realização preferida, o polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47 tem a sequência AX₁X₂X₃AEQLR, em que X₁, X₂ e X₃ podem ser quaisquer aminoácidos e polipéptidos Hsp47, compreendendo, de um modo preferido, a sequência AVLSAEQLR.

A Figura 2 apresenta a relação entre a sequência de péptidos abrangendo os resíduos 96 a 104 de Hsp47 humano em comparação com motivos semelhantes verificados noutras moléculas antigénicas específicas HLA-A e IL-12. Desta forma, no método de redução de danos mediados pelo sistema imunitário, qualquer polipéptido imunoprotector envolvendo Hsp47 envolvendo HLA-A, Hsp47 e IL-12 e fragmentos imunoprotectores ou suas variantes.

Conforme aqui utilizado, o termo "polipéptido Hsp47" refere-se a um polipéptido com a sequência estabelecida na Figura 1. O termo também inclui proteínas que têm, pelo menos, 70% de identidade da

sequência de aminoácidos com a sequência estabelecida na Figura 1, de um modo mais preferido, superior a 90% e, de um modo muito preferido, superior a 95% de identidade com a sequência estabelecida na Figura 1. O termo também se refere a uma proteína codificada por um ácido nucleico, que é capaz de hibridizar com um ácido nucleico tendo a sequência estabelecida na Figura 1 em condições moderadas ou estringentes, como estabelecido adiante de forma mais pormenorizada. A definição de polipéptido Hsp47 também inclui fragmentos imunoprotectores e variações alélicas, bem como modificações introduzidas por uma técnica recombinante para substituir, introduzir ou eliminar um ou mais resíduos de aminoácidos.

A sequência completa de ADNC de Hsp47 humano está estabelecida na Figura 1A. Compete aos especialistas da técnica preparar polipéptidos Hsp47 purificados recombinantes ou sintéticos. Também compete aos especialistas da técnica, identificar outro ADNC de Hsp47 e polipéptidos de vertebrados, como mamíferos, e empregar esses ADNC não humanos e polipéptidos Hsp47 em tais composições e métodos em epígrafe. Por exemplo, são conhecidas as contrapartidas ao Hsp47 humano na galinha e no rato. Como tal, os polipéptidos Hsp47, conforme aqui utilizados, incluem polipéptidos Hsp47 e fragmentos imunoprotectores e as suas variantes de todos os vertebrados, de um modo preferido, mamíferos e de um modo muito preferido, humanos. Relativamente às variantes e aos fragmentos de proteínas Hsp47 de comprimento integral que são aqui utilizados, "imunoprotectores" e os seus equivalentes gramaticais significam que as variantes ou fragmentos são capazes de reduzir ou eliminar danos nas células, órgãos ou tecidos que são provocados por

linfócitos activados, células NK ou células do tipo NK, como comparados a danos em células, órgãos ou tecidos que seriam provocados por tais células na ausência do agente imunoprotector.

No que respeita a fragmentos de péptidos do polipéptido Hsp47 de comprimento integral ou outro polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47 que serão aqui utilizados, estes fragmentos da sequência de aminoácidos terão, geralmente, pelo menos, cerca de 8 aminoácidos consecutivos, normalmente pelo menos cerca de 10 aminoácidos consecutivos, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 15 aminoácidos consecutivos e, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 20 aminoácidos consecutivos da sequência de proteínas do Hsp47. A sequência activa pode ser ligada ou ligada de forma não covalente numa cadeia ou como uma cadeia lateral de outros péptidos ou proteínas, para vários objectivos.

Os polipéptidos imunoprotectores Hsp47, bem como outros polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47 que são aqui utilizados, podem incluir uma ou mais substituições, eliminações ou introduções de aminoácidos. As substituições conservadoras típicas são mostradas no Quadro 1 com o título de Substituições preferidas. Se tais substituições não resultarem numa alteração da actividade biológica, logo mais alterações substanciais, denominadas Substituições de exemplo no Quadro 1, ou como descrito abaixo com referência às classes de aminoácidos, são introduzidas e os produtos analisados.

QUADRO 1

Resíduo Original	Substituições de Exemplo	Substituições Preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cis (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gli (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	tre	tre
Tre (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; tre; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Os ácidos nucleicos que codificam o polipéptido Hsp47 que são utilizados nestas composições e métodos irão ter, pelo menos, cerca de 70%, geralmente pelo menos cerca de 75%, mais de um modo geral, pelo menos, cerca de 80%, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 85%, de um modo mais preferido, pelo menos, cerca de 90% e de um modo ainda mais preferido, cerca de 95% da identidade da sequência de nucleótidos com a sequência de nucleótidos correspondente apresentada na Figura 1A.

A “percentagem (%) de identidade da sequência de aminoácidos” em relação às sequências do polipéptido Hsp47 aqui identificadas é definida como a percentagem de resíduos de aminoácidos numa sequência candidata que é idêntica aos resíduos de aminoácidos na sequência de Hsp47 humana de tipo selvagem (ver a Figura 1A), após ter alinhado as sequências e introduzido lacunas, se necessário, para obter a maior percentagem de identidade de sequência e não considerando quaisquer substituições conservadoras como parte da identidade de sequência. A “percentagem (%) de identidade da sequência de nucleótidos” em relação às sequências de codificação do polipéptido Hsp47 aqui identificadas é definida como a percentagem de nucleótidos numa sequência candidata que é idêntica à sequência de nucleótidos apresentada na Figura 1, após ter alinhado as sequências e introduzido lacunas, se necessário, para obter a maior percentagem de identidade de sequência. Os valores de percentagem de identidade aqui utilizados são produzidos por WU-BLAST-2, que foi obtido a partir de (Atschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996); disponível na Internet em blast.wustl.edu/blast/README.html). O WU-BLAST-2 utiliza vários parâmetros de pesquisa, a maioria dos quais são semelhantes aos

predefinidos. Os parâmetros ajustáveis são definidos de acordo com os seguintes valores: amplitude de sobreposição = 1, fracção de sobreposição = 0,125, limiar de palavras (T) = 11. Os parâmetros HSP S e HSP S2 são valores dinâmicos e são estabelecidos pelo próprio programa, dependendo da composição da sequência particular e da composição da base de dados particular em que a sequência de interesse está a ser pesquisada; contudo, os valores podem ser ajustados de forma a aumentar a sensibilidade. Um valor de percentagem de identidade da sequência de aminoácidos é determinado pelo número de resíduos idênticos correspondentes, dividido pelo número total de resíduos da sequência "mais comprida" na região alinhada. A sequência "mais comprida" é a que comporta a maioria dos resíduos reais na região alinhada (lacunas introduzidas pelo WU-Blast-2 para maximizar os resultados de alinhamento são ignoradas).

Os polipéptidos Hsp47 ou outros polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47 que são aqui utilizados podem ser fundidos em sequências heterólogas de aminoácidos, de forma a fornecer proteínas quiméricas ou de fusão que irão ser utilizadas na presente invenção. Adicionalmente, os polipéptidos Hsp47 e polipéptidos relacionados com Hsp47 que irão ser aqui utilizados podem ser obtidos a partir de expressão recombinante de sequências de nucleótidos que codificam o(s) polipéptido(s) pretendido(s). A este respeito, as sequências de nucleótidos que codificam os polipéptidos Hsp47 da presente invenção irão hibridizar-se numa sequência de nucleótidos apresentada na Figura 1 em condições moderadamente estridentes, de um modo preferido, sob condições estridentes. Conforme aqui utilizado, "condições estridentes"

significa (1) empregar uma força iónica reduzida e uma temperatura elevada para lavagem, por exemplo, 15 mM de cloreto de sódio/1,5 mM de citrato de sódio (0,1x SSC)/0,1% de dodecilssulfato de sódio a 50 °C, ou (2) empregar durante a hibridização um agente desnaturante, como formamida, por exemplo, 50% (vol/vol) de formamida com 0,1% de albumina sérica bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/50 nM de tampão de fosfato de sódio com pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio (5x SSC) a 42 °C. Outro exemplo é a utilização de 50% de formamida, 5x SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6/8), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, ADN de esperma de salmão submetido a ultra-sons (50 µg/mL), 0,1% de SDS e 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, com lavagens a 42 °C em 0,2x SSC e 0,1% de SDS. Outro exemplo é a hibridização através de um tampão de 10% de sulfato de dextrano, 2x SSC e 50% de formamida a 55 °C, seguida de uma lavagem de elevada estringência consistindo em 0,1x SSC contendo EDTA a 55 °C.

“Condições moderadamente estringentes” são descritas em Sambrook *et al.*, *supra* e incluem a utilização de uma solução de lavagem e condições de hibridização (e. g.: temperatura, força iónica e % SDS) menos estringentes do que as descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente estringentes é uma condição como a incubação, durante a noite a 37 °C numa solução que inclui: 20% de formamida, 5x SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 7,6), 5 x solução de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano e 20 mg/mL de ADN de esperma de salmão desnaturado e cortado, seguido de lavagem dos filtros em 1x SSC a cerca de 37–50 °C. O especialista na técnica saberá como regular a

temperatura, a força iónica, etc., conforme necessário, para abranger factores como o comprimento da sonda e semelhantes.

“Isolado”, quando utilizado para descrever os vários polipéptidos Hsp47 ou polipéptidos relacionados com Hsp47 aqui divulgados, significa que o polipéptido foi identificado e separado e/ou recuperado de um componente do seu ambiente natural. Os componentes contaminantes do seu ambiente natural são materiais que iriam normalmente interferir com utilizações de diagnóstico ou terapêuticas para o polipéptido e, podem incluir, enzimas, hormonas e outros solutos proteínicos ou não proteínicos. Em incorporações preferidas, o polipéptido será purificado (1) a um nível suficiente para obter, pelo menos, 15 resíduos da sequência de aminoácidos do terminal N ou interna através da utilização de um sequenciador de câmara rotativa, ou (2) até à homogeneidade através de SDS-PAGE em condições não redutoras ou redutoras utilizando azul de Coomassie ou, de um modo preferido, coloração por prata. O polipéptido isolado inclui polipéptido *in situ* no interior de células recombinantes, dado que, pelo menos, um componente do ambiente natural do polipéptido Hsp47 não estará presente. Contudo, em situações normais, o polipéptido isolado será preparado através de, pelo menos, uma etapa de purificação. Os polipéptidos Hsp47 isolados não contêm, de um modo preferido, anticorpos específicos ao Hsp47 ligados aos mesmos.

Um ácido nucleico “isolado” que codifica um polipéptido Hsp47 ou polipéptidos relacionados com Hsp47 é uma molécula de ácido nucleico que é identificada e separada de, pelo menos, uma molécula de ácido nucleico contaminante à qual está, de um modo geral,

associada na origem natural do ácido nucleico que codifica os polipéptidos relacionados com Hsp47. Uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptidos relacionados com Hsp47 é diferente da contida na forma ou definição que é encontrada na natureza. Moléculas isoladas de ácido nucleico que codificam polipéptidos relacionados com Hsp47 são, portanto, distinguidas das moléculas de ácido nucleico que codificam polipéptidos relacionados com Hsp47, tal como existem nas células naturais. Todavia, uma molécula isolada de ácido nucleico que codifica polipéptidos relacionados com Hsp47 inclui moléculas de ácido nucleico que codificam polipéptidos Hsp47 contidas em células que expressam, de um modo geral, o polipéptido Hsp47 em que, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossômica diferente da das células naturais.

O termo “sequências de controlo” refere-se a sequências de ADN necessárias para a expressão de uma sequência de codificação ligada operavelmente num organismo hospedeiro particular. As sequências de controlo que são adequadas para procariotas, por exemplo, incluem um promotor, opcionalmente uma sequência operadora e um local de ligação ribossômica. As células eucarióticas são conhecidas por utilização de promotores, sinais de poliadenilação e intensificadores.

O ácido nucleico é “ligado operavelmente” quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácidos nucleicos. Por exemplo, ADN para uma pré-sequência ou líder secretório está ligado operavelmente a ADN para um polipéptido, o caso seja expresso, como uma pré-proteína que participa na secreção do polipéptido; um

promotor ou intensificador está ligado operavelmente a uma sequência de codificação se afectar a transcrição da sequência; ou um local de ligação ribossómica está ligado operavelmente a uma sequência de codificação se estiver posicionado de forma a facilitar a tradução. De um modo geral, "ligado operavelmente" significa que as sequências de ADN a ligar são contíguas e, no caso de um líder secretório, contíguas e em fase de leitura. Contudo, os intensificadores não precisam de ser contíguos. A associação é estabelecida através de ligação em locais convenientes de restrição. Se esses locais não existirem, os adaptadores ou ligantes oligonucleotídicos sintéticos são utilizados de acordo com a prática convencional.

O termo "anticorpo" é utilizado no sentido mais lato e abrange especificamente os anticorpos simples monoclonais de polipéptidos anti-Hsp47 (incluindo agonistas, antagonistas e anticorpos neutralizantes) e composições de anticorpos anti-Hsp47 com especificidade poliepitópica. Os anticorpos não se ligam de um modo preferido, aos epítomos reactivos com Mab N6 ou anticorpo monoclonal SPA470. Num aspecto, os anticorpos são específicos para epítomos definidos pelas sequências de consenso acima mencionadas. O termo "anticorpo monoclonal" é aqui utilizado como referindo-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogéneos, *i. e.*, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, excepto para possíveis mutações que ocorrem no meio natural e que podem estar presentes em quantidades mínimas.

Os termos “tratar”, “tratamento” e “terapia” como aqui utilizados referem-se a terapia curativa, terapia profiláctica e terapia preventiva.

O termo “mamífero” conforme aqui utilizado refere-se a quaisquer animais classificados como mamíferos, incluindo seres humanos, vacas, cavalos, cães e gatos. Numa forma de realização preferida da invenção, o mamífero é um humano.

Os polipéptidos relacionados com Hsp47 ou os fragmentos dos mesmos podem ser marcados através de técnicas normalizadas para incorporar radiomarcações, e. g., ^{32}P , marcações fluorescentes, etc. Podem ser acrescentadas fracções adicionais para facilitar a purificação dos polipéptidos por si só ou em associação com a ligação a uma célula. Por exemplo, os polipéptidos Hsp47 que incluem uma marcação fluorescente facilitam uma triagem de células activada por fluorescência. Adicionalmente, as fracções que são capazes de interagir com um campo magnético podem ser ligadas ao Hsp47. No segundo caso, esférulas magnéticas ligadas a avidina podem ser utilizadas em combinação com o polipéptido Hsp47 marcado com biotina.

O Hsp47 foi identificado como uma proteína induzida em células endoteliais tratadas com brefeldina A. Além do Hsp47 (identificado como a banda de 46,5 KDa na Figura 14A e como p47 na Figura 14B), outras proteínas são induzidas por brefeldina A. Estas incluem a proteína designada p27 na Figura 14B e uma banda difusa acima de p47 na Figura 14B com um peso molecular de aproximadamente 60-70 KDa. Tais proteínas adicionais podem também ser polipéptidos

imunoprotectores úteis na inibição da resposta imunitária por si só ou em combinação com todas as outras proteínas induzidas por brefeldina A.

As moléculas anteriores podem ser utilizadas para identificar células que se ligam ao polipéptido Hsp47 ou aos seus fragmentos. A detecção da presença de tais marcações pode ser realizada por qualquer técnica convencional, tais como radiografia, detecção de fluorescência, triagem de células activada por fluorescência e divergência num campo magnético, dependendo do tipo particular de polipéptido Hsp47 modificado utilizado.

As composições em epígrafe são utilizadas de várias formas. Para fins de investigação, podem ser utilizadas para analisar o trajecto fisiológico associado à imunoprotecção e/ou activação e inactivação de linfócitos T, células NK e outros tipos de células NK do sistema imunitário, bem como imunoprotecção de vários tecidos de mamíferos, incluindo endotélio vascular. Por exemplo, é possível combinar linfócitos, particularmente linhagens celulares CTL com alvos de péptidos conhecidos em combinação com as composições em epígrafe, na presença e ausência de células que apresentam antígenos aos quais os CTL estão restritos. Após a lise efectuada pelos CTL, pode, então, separar-se as células CTL activadas das células CTL quiescentes através do marcador CD69, sendo este marcador regulado por aumento *in vitro* após a activação. A separação pode ser realizada utilizando FACS e anti-CD69 marcado por fluorescência.

Ao isolar a maioria das células fluorescentes, e. g., os 25% superior, procede-se então à lise das células e isolamento das proteínas associadas com os marcadores em epígrafe, por exemplo, cromatografia, electroforese não desnaturante ou semelhantes. Em alternativa, separa-se as proteínas através de electroforese e utiliza-se depois uma transferência de Western ou outra técnica com os péptidos marcados para identificar proteínas, às quais se ligam os péptidos em epígrafe. Em vez de uma radiomarcção, qualquer outro tipo de marcação pode ser empregue, normalmente uma pequena molécula orgânica, tais como biotina, um agente fluorescente e semelhantes. Quando é utilizada biotina, após a separação, pode ser utilizada avidina, em cujo caso a avidina é marcada com uma etiqueta como descrito anteriormente.

Também é possível comparar linfócitos que foram combinados com células que apresentam antígenos na presença e na ausência das composições imunoprotectoras em epígrafe. Podem ser preparadas bibliotecas de ADNc em cada instância e empregues análises diferenciais representacionais, subtração ou métodos semelhantes para detectar as diferenças na expressão entre as células que foram activadas na presença e na ausência das composições em epígrafe. Também é possível determinar se subconjuntos particulares de linfócitos ou outras células do sistema imunitário respondem, de um modo diferente de outros subconjuntos às composições imunomodificadoras em epígrafe através de expressão ou ausência de expressão ou de uma ou mais proteínas, particularmente proteínas da membrana de superfície. Desta forma, podem ser identificados linfócitos que podem ser removidos por leucoforese ou semelhantes, para diminuir um ataque indesejado dos linfócitos aos tecidos.

Dependendo da sua utilização prevista, nomeadamente para a administração em mamíferos hospedeiros, os polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47, e. g., polipéptidos Hsp47, podem ser modificados para alterar a sua distribuição no sistema sanguíneo, diminuir ou reforçar a ligação a componentes do sangue, aumentar a vida útil do polipéptido no sistema sanguíneo e acções semelhantes. Os polipéptidos imunoprotectores podem ser ligados a estes outros componentes por ligantes que são ou não passíveis de clivagem no ambiente fisiológico do sangue. Os polipéptidos imunoprotectores podem ser ligados em qualquer ponto do polipéptido onde esteja presente um grupo funcional, como hidroxilo, tiol, carboxilo, amino ou semelhantes. De um modo desejável a ligação será no terminal N ou no terminal C.

As composições imunoprotectoras relacionadas com Hsp47 da presente invenção podem também ser ligadas a uma ampla variedade de outros oligopéptidos ou proteínas para uma variedade de objectivos. Por exemplo, componentes das composições em epígrafe podem ser ligados covalentemente a um imunógeno para produzir anticorpos a componentes das composições em epígrafe, em que os anticorpos podem servir para identificar outros péptidos com uma conformação comparável. Além disso, os anticorpos podem ser utilizados para preparar anticorpos anti-idiotípicos que podem competir com as proteínas ou péptidos em epígrafe para a ligação a um ponto-alvo. Estes anticorpos anti-idiotípicos podem, então, ser utilizados para identificar proteína às quais as proteínas e/ou péptidos em epígrafe se ligam. De um modo alternativo, os polipéptidos imunoprotectores podem ser expressos em combinação com outros

péptidos ou proteínas, de forma a ser uma porção da cadeia, interna ou no terminal N ou C. Ao permitir a expressão das proteínas e péptidos em epígrafe, várias modificações pós-expressão podem ser concretizadas. Por exemplo, ao empregar as sequências adequadas de codificação, é possível permitir a lipidação, e. g., prenilação ou miristoilação. Nesta situação, os polipéptidos imunoprotectores serão ligados a um grupo de lípidos num terminal, de forma a serem capazes de ligar-se a uma membrana lipídica, tal como um lipossoma. Podem ser utilizados lipossomas para a administração, em cujo caso podem ser introduzidos fármacos no lúmen do lipossoma, de forma a cooperar com os polipéptidos em epígrafe, na protecção de tecidos contra danos mediados pelo sistema imunitário. Assim, podem ser incluídos imunossupressores no lúmen, para que as composições em epígrafe e o imunossupressor possam actuar de forma localizada.

Os polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47, como Hsp47, podem ser PEGilados, em cujo caso o grupo polietilenoxílico permite um aumento vida útil no sistema sanguíneo. Os polipéptidos derivados de Hsp47 ou outros polipéptidos imunoprotectores podem também ser combinados com outras proteínas, como o Fc de um isótipo IgG que pode ser de ligação complementar ou complemento de não ligação ou com uma toxina, como ricina, abrina, toxina de difteria ou semelhantes, particularmente a cadeia A.

Os polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47 podem ser modificados numa ampla variedade de formas. É possível preparar análogos de sequência através de síntese de oligopéptidos ao utilizar uma substituição por etapas dos aminoácidos em cada

posição por alanina ou valina, particularmente alanina. Geralmente, o número total de aminoácidos substituídos não deverá exceder 3, variando desde 1 a 3, habitualmente 1 a 2. Métodos para a produção de mutações "por sequenciação" são conhecidos pelos especialistas na técnica e foram utilizados com êxito com vários péptidos diferentes. Exemplos de protocolos para mutações por sequenciação podem ser encontrados em Gustin, *et al. Biotechniques* 14:22 (1993); Barany, *Gene* 37:111-123 (1985); Colicelli, *et al. Mol Gen Genet* 199:537-539 (1985) e Prentki, *et al. Gene* 29:303-313 (1984).

Pode-se preparar estas composições ao preparar um gene que codifica um polipéptido imunoprotector relacionado com Hsp47, como o polipéptido Hsp47 (ver, *e. g.*, Figura 1A). O gene pode ser introduzido num vector de expressão adequado; existem muitos vectores de expressão disponíveis no mercado, através dos quais o gene é então expresso num hospedeiro apropriado. Consulte Sambrook *et al.*, *Molecular Biology: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NI, 1989.

Os polipéptidos imunoprotectores relacionados com Hsp47 podem ser preparados por síntese ou através da utilização de técnicas recombinantes, como indicado acima. Estão disponíveis vários aparelhos sintéticos comerciais, por exemplo, sintetizadores automatizados da Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, Beckman, etc. Ao utilizar sintetizadores, os aminoácidos existentes no meio natural podem ser substituídos com aminoácidos não naturais, particularmente, D-estereoisómeros, cadeias laterais com diferentes comprimentos ou funcionalidades e semelhantes. Para técnicas recombinantes, é possível preparar uma sequência de ácidos

nucleicos que codifica uma pluralidade dos polipéptidos em epígrafe em cascata, com a intervenção de um aminoácido ou de uma sequência, que permite a clivagem para o polipéptido simples ou dímero completo. Quando a metionina está ausente, é possível ter uma intervenção de metionina que permite a clivagem de um aminoácido simples. Em alternativa, é possível introduzir sequências de consenso que são reconhecidas por proteases particulares para clivagem enzimática. A sequência particular e a forma de preparação serão determinadas por requisitos de conveniência, economia, pureza necessária e semelhantes.

Para a maioria, as composições que são utilizadas irão compreender, pelo menos, 20% em peso do produto de polipéptido pretendido, mais geralmente pelo menos cerca de 75% em peso, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 95% em peso, e para fins terapêuticos, geralmente, pelo menos, cerca de 99,5% em peso, em relação a contaminantes relacionados com o método de preparação do produto e respectiva purificação. Geralmente, as percentagens serão baseadas no polipéptido total.

Por "brefeldina A", entende-se o composto que apresenta a fórmula química 1,6,7,8,9,11a,12,13,14,14a-deca-hidro-1,13-di-hidroxi-6-metil-4H-ciclopent(f)oxaciclotridecin-4-ona que é usualmente conhecida na área como brefeldina A, bem como outros membros da classe de fármacos da brefeldina A ou outros fármacos com o mesmo mecanismo de acção ou semelhantes.

Por "quantidade imunoprotectora", entende-se a quantidade de brefeldina A ou polipéptido imunoprotector ou ácido nucleico

exprimível que o codifica que é capaz de reduzir ou eliminar a destruição mediada de linfócitos, células NK ou células do tipo NK, de um modo preferido, um tecido endotelial vascular. As quantidades imunoprotectoras podem divergir em função da indicação para a qual a composição é utilizada e podem ser empiricamente determinadas e sem experimentações indevidas por especialistas comuns na técnica.

Em relação à brefeldina A, este fármaco, assim como fármacos da mesma classe e fármacos com os mesmos mecanismos de acção ou semelhantes, são bem conhecidos e empregues regularmente na área (consultar, por exemplo, Jiang *et al.*, *supra* e Wada *et al.*, *supra*).

As composições em epígrafe que incluem brefeldina, polipéptidos relacionados com HuHsp47 e ácidos nucleicos exprimíveis que codificam tais polipéptidos imunoprotectores ou combinações dos mesmos podem ser utilizadas *in vitro* para inibir a lise por linfócitos T ou NK de células que apresentam o antígeno alvo, nomeadamente células endoteliais vasculares. Assim, em investigação, em situações onde se pretende manter misturas de células, em que os linfócitos poderão ser activados e matar células que apresentam o antígeno, como macrófagos ou linfócitos B ou outras células que podem actuar como células alvo, *e. g.*, células neoplásicas, células infectadas por vírus ou semelhantes, a lise pode ser inibida de modo a que a população celular seja mantida durante a investigação.

As composições em epígrafe que incluem polipéptidos relacionados com HuHsp47 e ácidos nucleicos exprimíveis que codificam tais polipéptidos imunoprotectores ou as suas combinações

podem também ser utilizadas *ex vivo*. Em casos de transplante de órgãos ou células, mais particularmente órgãos sólidos ou células particulares, *e. g.*, medula óssea, xenogénica ou alogénica, o órgão ou células do dador podem ser banhados num meio que inclua as composições em epígrafe. Desta forma, os linfócitos presentes no implante serão inibidos de participar na reacção enxerto *versus* hospedeiro. De modo geral, a concentração da composição irá variar no meio, em função da actividade da composição, do nível de inibição pretendido, da presença de outros compostos que afectam a activação de CTL e factores semelhantes. Normalmente, a concentração estará compreendida entre cerca de 0,1 e 100 µg/mL de polipéptido, mais geralmente no intervalo de cerca de 1 a 10 µg/mL, embora concentrações fora desse intervalo possam também ser utilizadas. Outros componentes do meio de banho serão geralmente constituintes, normalmente utilizados, numa solução de preservação de órgãos, por exemplo, HBSS. O tempo de manutenção do órgão no meio situar-se-á geralmente entre cerca de 2 e 72 h.

As composições em epígrafe que incluem polipéptidos relacionados com HuHsp47 e ácidos nucleicos exprimíveis que codificam tais polipéptidos imunoprotectores ou as suas combinações podem também ser empregues *in vivo*, ao administrar as composições em epígrafe através de qualquer meio adequado para o tratamento de doenças autoimunes ou para facilitar transplantes de órgãos ou células (*e. g.*, transplantes de medula óssea). No caso de transplante, as composições em epígrafe podem ser administradas antes da implantação, começando geralmente a administração o mais tardar cerca de 14 dias antes da implantação, havendo de um modo preferido uma dose administrada no prazo de três dias após o

transplante. As composições em epígrafe podem ser administradas no período que começa cerca de 6 horas antes da implantação e podem ser, depois prosseguidas de acordo com um programa predeterminado, geralmente não superior a 30 dias, mais geralmente não superior a 20 dias. Contudo, após a implantação, as composições em epígrafe podem ser administradas conforme necessário, em função da resposta do receptor ao órgão ou às células. Em algumas situações, as composições em epígrafe podem ser administradas cronicamente, desde que o implante esteja presente no hospedeiro. Outras formas de utilização *in vivo* incluem a injeção das composições em epígrafe em áreas de inflamação, *por exemplo*, articulações, ligamentos, tendões e semelhantes, bem como vários órgãos, tal como o fígado.

Outros imunossuppressores que podem estar presentes durante o tratamento *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* incluem formas injectáveis, parentéricas ou tópicas de cortisona, hidrocortisona, corticosteróides modificados, ciclosporina A, FK506, Imuran, azatioprina, D-penicilamida, MMF (Mofetyl), metotrexato, ciclofosfamida, preparações de ouro, salicilatos, sulfazalisina, antimaláricos e anti-inflamatórios não esteróides (AINE). Podem igualmente ser utilizados agentes biológicos em conjunto com as composições em epígrafe, incluindo anti-CD5, anticorpo monoclonal Campath, anti-CD4, toxina de fusão de difteria-IL-2, TNF-R solúvel e dímero, IL-1-R solúvel, anticorpo monoclonal anti-TNF-alfa quimérico, anticorpo monoclonal anti-ICAM-1, OKT3, soro anti-timócito/A6, anti-IL6, anti-IL-2, antiCD7, bem como anticorpos para CD4, CD8, CD3, LFA-1 e CD28. Serão empregues dosagens sub-terapêuticas, geralmente quando presentes, não inferiores que cerca

de 5% da dosagem normal e não superiores a cerca de 75%, normalmente na gama de cerca de 10 e 60%.

Em alguns casos, as composições em epígrafe podem ser administradas em combinação com vários imunoestimulantes. Tais incorporações existem quando o sistema imunitário foi comprometido, por exemplo, através de agentes quimioterapêuticos. Em tais casos, é desejável reforçar a resposta imunitária. A utilização das composições em epígrafe em combinação com imunoestimulantes, como IL-2 e outras interleucinas, interferões, citocinas ou quimioquinas, reduz os efeitos secundários associados às mesmas. Tais melhorias nos efeitos secundários incluem a correcção da síndrome de fuga vascular que está frequentemente associada a tratamentos com imunoestimulantes.

Geralmente, um bólus da composição em epígrafe que é administrado estará na gama de cerca de 0,1 a 50, mais habitualmente desde cerca de 1-25 mg/kg, do hospedeiro. O hospedeiro pode ser qualquer mamífero, incluindo animais domésticos, animais de estimação, animais de laboratório, primatas e, particularmente humanos. A quantidade será geralmente ajustada em função da semi-vida do fármaco ou polipéptido imunoprotector, em que a semi-vida será geralmente de, pelo menos, um minuto, mais geralmente de pelo menos 10 minutos e, de um modo preferido, na gama de cerca de 10 minutos a 12. Semi-vidas curtas são aceitáveis, desde que a eficácia possa ser obtida com dosagens individuais ou uma perfusão contínua ou ainda dosagens repetitivas. É possível utilizar dosagens na parte inferior do intervalo e dosagens ainda mais baixas, em situações em que o fármaco ou polipéptido disponha

de uma semi-vida aumentada ou seja fornecido como um depósito, como uma composição de libertação lenta, incluindo partículas, introduzindo numa matriz que mantenha o péptido durante um período prolongado de tempo, por exemplo, uma matriz de colagénio, a utilização de uma bomba que efectue uma perfusão contínua do péptido durante um período prolongado de tempo a uma taxa substancialmente contínua ou semelhantes.

O transplante pode envolver qualquer órgão ou células, incluindo órgãos como um coração, rins, pulmão, olhos, fígado, intestinos, vaso vascular ou outros órgãos, e células, como (células β dos ilhéus de Langerhans, células de medula óssea ou outras células, em que o órgão ou as células sejam alogénicos ou xenogénicos, particularmente quando um ou mais dos antígenos MHC de classe I ou II sejam diferentes no dador em comparação com o receptor.

As composições imunoprotectoras em epígrafe que incluem polipéptidos imunoprotectores relacionados com HuHsp47 e ácidos nucleicos que os codificam, por si próprias como conjugados ou como as suas combinações, podem ser preparadas como fórmulas em meios farmacêuticos aceitáveis, por exemplo, soro fisiológico, solução tampão de fosfato (PBS), etanol aquoso, glicose, propilenoglicol ou semelhantes ou como fórmulas sólidas em excipientes adequados, geralmente a uma dose farmacologicamente eficaz. As concentrações de polipéptido HuHsp47 ou outro polipéptido imunoprotector relacionado serão determinadas empiricamente de acordo com processos convencionais para o objectivo em particular. As formulações podem incluir agentes bactericidas, estabilizadores,

soluções tampão ou semelhantes. A quantidade administrada ao hospedeiro irá variar em função do que está a ser administrado, objectivo de administração, tal como profilaxia ou terapia, do estado do hospedeiro, da forma de administração, da quantidade de administrações e do intervalo entre as administrações e semelhantes. No sentido de aumentar a semi-vida das composições em epígrafe, as composições podem ser encapsuladas, introduzidas no lúmen de lipossomas, preparadas como um colóide ou podem ser empregues outras técnicas convencionais que forneçam uma vida útil prolongada das composições *ex vivo* ou *in vivo*. Em geral, doses de quantidades imunoprotectoras podem ser acondicionadas sob a forma líquida ou sólida (*e. g.*, liofilisada) em recipientes adequados, como ampolas, etc. Se apresentar o estado líquido, a composição estará de um modo preferido, num meio farmacêutico aceitável (suporte). Se apresentar o estado sólido, deve ser preparada de modo a que, quando for reformulada como um líquido (*e. g.*, com água ou um suporte farmacêutico), seja formada uma composição aceitável de um ponto de vista farmacêutico.

Os exemplos revelam o efeito da brefeldina A e polipéptidos Hsp47, incluindo o polipéptido AVLSAEQLR, sobre a lise CIK de culturas de células endoteliais derivadas de amostras de cordão umbilical humano. Estas experiências demonstraram que a lise CIK das células endoteliais é inibida pela brefeldina A e por, pelo menos, Hsp47 que é expresso mediante contacto com as células endoteliais com brefeldina A. A discussão seguinte resume os exemplos aqui incorporados, bem como outros resultados experimentais. Todavia, tais resultados são meros exemplos do âmbito da invenção, no aspecto em que os métodos e composições da

invenção podem ser utilizados para corrigir não só a lise indesejada de células endoteliais, como também os danos mediados pelo sistema imunitário em outras células, tecidos e órgãos. Além disso, o efeito de tais composições e métodos não se limita às células CIK, mas sim a células T citotóxicas restritas não MHC I e linfócitos NK em geral. A este respeito, deve ser, também, assinalado que, enquanto os métodos e composições da invenção inibem os linfócitos CTL restritos não MHC I, outros modos de resposta imunitária não são, significativamente, afectados. A este respeito, foi realizada uma experiência BMT com irradiação de corpo inteiro em ratinhos tratados com ou sem um polipéptido Hsp47. A reacção enxerto vs. hospedeiro apareceu no grupo não tratado com Hsp47. Dos membros do grupo tratado com Hsp47, nenhum desenvolveu uma reacção enxerto vs. hospedeiro. Além disso, nenhum desenvolveu infecções oportunistas durante o período de tempo do teste que, caso contrário, seriam esperadas se todo o sistema imunitário fosse suprimido.

Os exemplos demonstram que os CIK alogénicos e autólogos, possuem uma elevada citotoxicidade em relação a uma variedade de alvos tumorais hematopoiéticos e sólidos, incluindo tumores linfóides, mielóides e sólidos, bem como em relação a células endoteliais cultivadas *in vitro*. Os CIK também efectuem a lise de outros alvos cancerígenos (Lopez *et al.*, *Faseb. J.* 9:A1024 (1995); Lu *et al.*, *J. Immunol.* 153:1687-1696 (1994); Mehta *et al.*, *Blood* 86:3493-3499 (1995); Schmidt-Wolf *et al.*, *Ann. Hematol.* 74:51-56 (1997)). Todos os alvos estudados expressam níveis normais de MHC I. O anticorpo monoclonal W6/32 anti-MHC de classe I, um anticorpo com uma capacidade comprovada para impedir ou perturbar as

interacções MHC I/TcR *in vitro* (Shields *et al.*, *Tissue Antigens* 51:567-570 (1998)) não bloqueia a lise de alvos mediada por células CIK. A natureza do efeito GvL mediado por células CIK foi demonstrada como sendo um processo puramente autólogo, em ensaios com libertação de ⁵¹Cr ao utilizar CIK derivados de sangue do cordão umbilical e alvos endoteliais derivados de cordão umbilical humano do mesmo dador. Isto é coerente com o conceito de que os CIK representam linfócitos T citotóxicos restritos MHC I não clássicos e exclui a possibilidade de que esta lise observada representa o resultado de alo-reconhecimento.

Os CIK são notáveis pelo seu forte efeito GvL, sem provocar um GvHD mensurável em modelos murinos, uma verificação também confirmada no homem. Esta verificação foi documentada através do modelo de depuração de tumores *in vivo* SCID/hu para linfoma de linfócitos B SU-DHL4 e leucemia mielogénica crónica (Lu *et al.*, *J. Immunol.* 153:1687-1696 (1994); Hoyle *et al.*, *Blood* 92:3318-3327 (1998)). Nos exemplos, foi utilizado um sistema SCID murino com aloenxertos ortotópicos de pele humana de espessura total para fornecer moléculas de adesão a células humanas nas paredes vasculares dos enxertos de pele. Isto demonstrou a ausência de alo-reconhecimento e de potencial GvHD pelos CIK. Os enxertos de pele formados não apresentaram sinais de infiltração, inflamação ou GvHD dos CIK. Apenas a neoangiogénese de derivação humana de tumores sólidos se torna o alvo selectivo de vigilância imunitária mediada pelos CIK, mas não as camadas fisiológicas vasculares normais fora das proximidades do tumor.

Diferenças distintas no reconhecimento de alvos dos CIK, tornam-se aparentes na análise de moléculas de adesão a células. Os estudos da requerente demonstram que a interacção de ICAM-1 em alvos tumorais com LFA-1 nas células efectoras CIK é fundamental para o processo da lise mediada por CIK de alvos tumorais. Esta interacção ICAM-1/LFA-1 parece não estar envolvida na lise de células endoteliais mediada por CIK. Estas verificações são coerentes com relatórios anteriores sobre os requisitos de linfócitos T CD3⁺56⁺ para a adesão a células alvo (Lu *et al.*, *J. Immunol.* 153:1687-1696 (1994); Schmidt-Wolf, *Cellular Immunology* 169:85-90 (1996)), em oposição à sua interacção com células endoteliais. Os CTL utilizam ICAM-1 e LFA-1 na sua interacção com alvos tumorais. As células NK, na ausência de ligação MHC I/TcR, efectuem a lise de alvos que não fornecem sinalização não assassina suficiente em situações onde o ICAM-1/LFA-1 fornece o único sinal de estimulação identificado. Verificou-se recentemente que o mecanismo de co-estimulação de linfócitos T através da ligação ICAM-1/LFA-1 envolve uma acumulação mediada por proteínas motoras de miosina de moléculas de sinalização co-estimuladoras na interface de células T/alvo tumoral, levando a um processo de sinalização amplificado e prolongado (Wulfing *et al.*, *Science* 282:2266-2269 (1998)). Este processo pode ser capturado em tempo real através de microvideografia *syn-capping* (Wulfing *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:6302-6307 (1998)). Esta interacção ICAM-1/LFA-1 é, também, fundamental para o processo de orientação de gânglios linfáticos para vénulas endoteliais altas (Lawrence *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 25:1025-1031 (1995); Oppenheimer-Marks *et al.*, *J. of Immunology* 145:140-148 (1990); Rosenman *et al.*, *J. of Leukocyte Biol.* 53:1-10 (1993)). A interacção ICAM-1/LFA-1 parece

não ser necessária para a sua interacção com EC não activadas, dado que foi revelado que este processo não apresenta isolamento de LFA-1 e TcR na sua interacção com células endoteliais (Kozeny *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 6:1170-1176 (1988)). A presença de uma lise tumoral dependente de ICAM-1/LFA-1 e um processo de lise de células endoteliais independente de ICAM1/LFA-1 sugere a existência de pelo menos duas vias distintas de citotoxicidade mediada pelos CIK.

A clonagem de células únicas de CIK demonstrou pela primeira vez que a lise endotelial de células T assassinas activados restritos MHC I não clássicos com actividade anti-tumoral é uma propriedade clonal das células T activadas. Os mecanismos de reconhecimento endotelial citotóxico e tumoral segregam, de forma independente, entre si clones individuais de CIK CD3⁺56⁺, que não exprimem capacidades de reconhecimento do alvo, uma delas ou ambas. A grande maioria dos clones CIK são linfócitos T α/β , mas também se demonstrou que as células T γ/δ podem diferenciar-se em linfócitos CIK citotóxicos.

A ausência de capacidade lítica por linfócitos CIK do alvo tumoral ou células endoteliais pode ser o resultado de, pelo menos, três formas clonais diferentes: Cada classe-alvo pode requerer uma cascata específica de moléculas de sinalização para a reconhecer; a ausência de determinados membros da cascata de sinalização num clone CIK particular, pode levar a uma sinalização ineficaz para um determinado alvo. Em alternativa, podem haver vários trajectos de sinalização, independentemente, inibidores a interferir com a execução de um evento de reconhecimento citotóxico; a protecção contra a lise de CIK pode resultar da capacidade de uma célula-alvo

de expressar um ligando respectivo. Por fim, a sensibilidade a um mecanismo de eliminação CIK particular, pode diferir entre alvos tumorais e células endoteliais; portanto, padrões individuais de expressão clonal e níveis individuais de mecanismos de ataque de alvos alternativos podem ser responsáveis pela diferença observada na lise dos alvos efectivos. A análise FACS demonstra que os alvos exprimem níveis elevados de MHC I e que os CIK funcionais exprimem α/β TcR (> 95%) ou γ/δ TcR (< 5%), CD3/CD5 (> 98%), CD8 (> 80%) ou CD4 (< 15%), moléculas KIR (coloração de 5 a 8% para DX9) e CD56 (> 25% em culturas em grande volume, > 98% de clones funcionais) (Lu *et al.*, *J. Immunol.* 153:1687-1696 (1994)). Todavia, não se consegue demonstrar um envolvimento funcional no reconhecimento e lise de alvos por CIK para quaisquer moléculas de adesão celular, para além das acima mencionadas LFA-1 e ICAM-1, nem para as principais proteínas de superfície de T e NK resumidas no Quadro 2.

As células efectoras foram tratadas com CMA e BFA (brefeldina A) (Kataoka *et al.*, *J. Immunol.* 156:3678-3686 (1996)) antes do ensaio de citotoxicidade com libertação de ^{51}Cr para avaliar a contribuição de perforina/granzima *versus* a citotoxicidade de CIK baseada em Fas para estes alvos. Os resultados da requerente demonstram que a lise de células endoteliais se baseia, praticamente, na totalidade em perforina e granzima, ao passo que alvos tumorais são eliminados através da utilização de ambos os trajectos. Investigações anteriores demonstraram que a lise mediada por CIK de alvos tumorais está dependente de cAMP e Ca^{2+} (Mehta *et al.*, *Blood* 86:3493-3499 (1995)).

Os resultados combinados do estudo de inibição da expressão de superfície FasL com o estudo de depleção de BFA e perforina com Concanamicina A, indicam que a citotoxicidade em relação a alvos tumorais é mediada através de granzima/perforina com uma contribuição significativa do trajecto Fas/FasL. Em contraste, a lise de células endoteliais é mediada, exclusivamente, através de granzima/perforina. Este resultado confirma que existem diferenças entre a fisiologia de células endoteliais e de alvos tumorais que contribuem para a sua sensibilidade aos CIK.

É possível que os CIK sejam células T auto-reactivas anérgicas limitadas (Schwartz, *Curr. Opin. Immunol.* 9:351-357 (1997)). Neste caso, representariam um grupo de linfócitos T com um complemento CD heterogénico e diferenciado que pode ou não ter perdido a sua função nessa altura (Guidos *et al.*, *J. of Exp. Med.* 172:835-845 (1990)). Condições semelhantes às de cultura de CIK podem levar a recuperação de células T anérgicas ao fornecer uma elevada dose de estimulação de IL-2, superando assim a anergia (Madrenas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9736-9741 (1996)).

Dada a pluralidade de marcadores de superfície também expressos em clones funcionais, a existência de uma linhagem específica de células T CIK e a expansão preferida de um tipo distinto de células precursoras verificadas no sangue periférico parece improvável. Em vez disso, a presença de marcadores de superfície em células T e NK que perderam a sua capacidade efectiva de sinalização quando testados em termos funcionais foi relatada como sendo uma característica identificadora de células anérgicas (Fink *et al.*, *J. Immunol.* 152:4270-4281 (1994)). A nossa

compreensão da biologia de células T e NK no estado anérgico, ainda, é limitada. Mas foi sugerido que elevados níveis de IL-2 permitem que células T e NK, anteriormente anérgicas, prossigam a divisão celular e desenvolvam novas especificidades funcionais já não auto-reativas (Alters *et al.*, *Transplantation* 56:633-638 (1993); Hoglund *et al.*, *Immunological Reviews* 155:11-28 (1997); Karpus *et al.*, *Int. Immunol.* 6:721-730 (1994); Karre, *Semin. Cancer Biol.* 2:295-309 (1991); Ljunggren *et al.*, *Immunol. Today* 11:237-244 (1990); Madrenas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9736-9741 (1996); Nossal, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 690:34-41 (1993); Rothenberg, *Adv. Immunol.* 51:85-214 (1992)). As doses elevadas de IL-2 fornecidas na cultura de CIK pode, assim, recuperar um grupo heterogéneo de células T anérgicas PBMC que, no processo de recuperação, não readquirem o seu anterior potencial de auto-reatividade. Além da expressão *de-novo* de moléculas efectoras envolvidas nas funções anti-tumorais recém-adquiridas, os CIK podem, portanto, preservar simplesmente os seus anteriores padrões individuais de expressão celular de receptores, agora, não funcionais. Este modelo permite a heterogeneidade observada de marcadores FACS presentes em CIK também funcionais, bem como a perda de função associada a TcR/MHC I, CD4 e CD8 observada na análise funcional da requerente.

Uma abordagem mais abrangente do processo de interacção de células T e NK citotóxicas com células endoteliais proveio da verificação de que a BFA bloqueava especificamente a lise de células endoteliais de uma forma reactiva à dosagem. Este é o primeiro relatório de um agente capaz de suprimir a lise de células endoteliais por células NK ou T activadas. A BFA induz um estado

resistente de células endoteliais que persiste durante pelo menos seis horas após a remoção do agente.

Foi divulgado que o tratamento com BFA conduz a uma série complexa de alterações em células tratadas, através de intoxicação selectiva de uma proteína G responsável pelo transporte de proteínas entre compartimentos cis e meios de Golgi. Este bloqueio de transporte resulta numa regressão de proteínas orientadas para a secreção para um maior sistema de ER e conduz finalmente à fusão dos compartimentos cis de Golgi com o retículo endoplasmático (Lippincott-Schwartz *et al.*, *Cell* 56:801-813 (1989)). O alargamento do compartimento do ER aumenta a síntese de proteínas residentes do retículo endoplasmático. As proteínas residentes do retículo endoplasmático são caracterizadas por um sinal de retenção do retículo endoplasmático "KDEL" ou "RDEL" com quatro aminoácidos no terminal C. Exemplos de tais proteínas residentes do retículo endoplasmático são o Hsp47, calreticulina, Grp78 e Grp94 (Ferreira *et al.*, *Arch. Virol.* 138:273-285 (1994); Ferreira *et al.*, *J. Cell Biochem.* 56:518-526 (1994); Ferreira *et al.*, *Connect Tissue Res.* 33:265-273 (1996); Smith *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:18323-18328 (1995)). Estas proteínas residentes do retículo endoplasmático não são segregadas pelo compartimento do retículo endoplasmático, porque se encontram numa forma dependente da reconhecida Ca^{2+} , ligada e reciclada para o retículo endoplasmático pelos receptores KDEL/RDEL, Erd2.1 e Erd2.2. O retículo endoplasmático actua como um grande armazém intracelular de Ca^{2+} . O alargamento do retículo endoplasmático pelo tratamento com BFA perturba a homeostasia celular de Ca^{2+} e conduz à inactivação do receptor KDEL/RDEL (Llewellyn *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research*

Communications 240:36-40 (1997)). As proteínas residentes do retículo endoplasmático, incluindo Hsp47, tornam-se livremente segregadas (Hu et al., *J. Cell Biochem.* 59:350-367 (1995); Hu et al., *J. Cell Biochem.* 59:214-234 (1995)). O tratamento com BFA de células endoteliais leva portanto a uma produção aumentada de Hsp47 e à secreção livre desta proteína que, de outra forma, seria uma proteína residente do ER. Em condições fisiológicas, o transporte de Hsp47 para o exterior da célula está ligado à expressão e ao co-transporte de colagénios I e IV acompanhados (Yamamura et al., *Biochem Biophys. Res. Comm.* 244:68-74 (1998)).

Extractos de proteínas marcadas para análise *pulse-chase* $^{35}\text{S}^*$ do estado resistente de células endoteliais induzido por BFA foram comparados com o fenótipo sensível não tratado. Entre as proteínas radiomarcadas de forma consistente, verificou-se um aumento nos extractos de células endoteliais tratadas com BFA de uma proteína com 46,5 KDa, p46.5. Através da separação por fases a 0-4 °C com Triton-X-114, a requerente foi capaz de demonstrar que a p46.5 estava, pelo menos, parcialmente localizada na membrana celular das células endoteliais tratadas. A biotinição das proteínas de superfície de camadas simples de EC, tratadas com BFA com o reagente solúvel em água e insolúvel em lípidos biotina-SS-NHS também demonstrou a regulação por aumento de Hsp47 e de uma proteína associada com 25-27 KDa na superfície celular após tratamento com BFA. Ver as Figuras 14A e 14B. De um ponto de vista bioquímico, o p46.5 ligou-se a e pôde ser purificado com gelatina-sepharose, através de eluição em tampões de eluição de ligação competitiva de péptido RGD e um tampão de eluição com pH baixo durante preparações de cromatografia líquida rápida de proteínas.

Todas as características bioquímicas do p46.5 coincidiram com dados publicados para o Hsp47 de roedores (Hirayoshi *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 11:4036-4044 (1991); Jain *et al.*, *Biochem J.* 304:61-68 (1994); Nandan *et al.*, *Biochem Cell Biol.* 68:1057-1061 (1990); Vaillancourt *et al.*, *Biochem J.* 274:793-798 (1991)). Uma análise funcional demonstrou que a p46.5 purificada com gelatina partilha com o tratamento com BFA a única capacidade de proteger EC anteriormente sensíveis a linfócitos CIK de uma forma reactiva à dosagem. Isto foi demonstrado através de pré-incubação de células endoteliais com p46.5 antes da realização do ensaio de citotoxicidade com ⁵¹Cr. Este é o primeiro relatório de um agente proteínico adicionado externamente que protege as células endoteliais de citotoxicidade não restrita de MHC I. Esta proteína p46.5 demonstrou uma reacção cruzada em imunoprecipitações com antissoros preparados contra proteínas de membrana do estado resistente de células linfoblastóides e com anticorpo monoclonal purificado de proteína pan-antichoque térmico N6.

A p46.5 foi identificada positivamente como sendo Hsp47 humano na membrana original da imunoprecipitação de N6 através do anticorpo monoclonal anti-Hsp47 específico SPA-470.

A sequência completa de *hsp47* humano foi descrita pela primeira vez por Clarke e Sandwal após isolamento baseado em PCR de fragmentos genéticos parciais, mas com sobreposição de ADNc, abrangendo a totalidade do gene do *hsp47* humano (Clarke *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1129:246-248 (1992)). Dois plasmídeos foram fornecido pelo Dr. Sanwal, correspondendo aos fragmentos parciais e com sobreposição de ADNc do *hsp47* com 350 e 1300 pb,

respectivamente. O fragmento mais pequeno também continha regiões não traduzidas 5' que não codificavam o produto genético maduro do gene *hsp47*. Na área de sobreposição entre os fragmentos, não existem locais partilhados por enzimas de restrição. A mutagénese orientada pelo local baseada em PCR foi utilizada para amplificar e unir derradeiramente os dois fragmentos de ADNc numa codificação estruturada de leitura contínua para a proteína Hsp47 humana. Com base nos dados de sequência publicados e na escolha da requerente de locais de clonagem, dois conjuntos de iniciadores foram designados para PCR. Foi introduzido um local BamHI artificial, a flanquear a extremidade 5' da sequência de codificação. Um local EcoRI artificial foi introduzido na extremidade 3' da sequência de codificação, bem como um local MscI em cada lado na técnica de sobreposição entre os dois clones para facilitar a união dos ADNc. Após a amplificação por PCR dos dois plasmídeos, o fragmento mais pequeno foi restrito a MscI e purificado por gel. Este fragmento mais pequeno foi utilizado como o iniciador 5' no fragmento de 1300 pb como modelo e produziu assim a primeira cassete genética expressa de *hsp47* humano. O produto de PCR desta reacção foi depois ligado direccionalmente no vector de expressão de proteína bacteriana pGEX-4T1 restrito por BamHI/EcoRI e amplificado *in vivo* de colónias simples de células hospedeiras bacterianas BL21(DE3) transformadas.

O *huhsp47* humano foi clonado sem o seu péptido de sinal "MRSLLLGTLCLLAVALA". O sistema de expressão de proteína bacteriana pGEX-4T foi utilizado para indução por IPTG para produzir em grande quantidade Hsp47 e obter uma proteína de fusão de Hsp47 humano e glutathione-S-transferase (GST) marcada no terminal N. Esta última

permitiu a utilização de um protocolo de purificação por afinidade de passo único em colunas de substrato de GST com glutathione reduzida com ligação transversal e eluição através de ligação competitiva deste parceiro de fusão com glutathione reduzida solúvel e livre. A própria GST demonstrou não ser tóxica na maioria dos ensaios celulares e não aumentou nem reduziu a toxicidade alvo nos ensaios de libertação de ^{51}Cr . O huHsp47 recombinante purificado protege as células endoteliais de uma forma reactiva à dosagem.

Uma sequência de iniciação de Kozak e um sinal de secreção funcional para uma expressão eucariótica ideal foram introduzidos através de uma combinação de PCR e clonagem de enzimas de restrição, utilizando o vector de expressão de proteína eucariótica de baculovírus pMel-Bac como modelo para as sequências de Kozak e de líder de secreção de melitina. A selecção do forte promotor CMV^{IE} foi realizada para garantir um elevado nível de expressão proteínica. O tratamento com BFA de EC resultou num aumento acentuado de Hsp47 segregado extracelular, apesar da presença de um sinal "RDEL" de retenção do ER no Hsp47. Como detalhado acima, o tratamento com BFA leva a uma perturbação do fluxo de Ca^{2+} do compartimento do ER que resulta numa retenção disfuncional do ER de proteínas KDEL/RDEL, incluindo o Hsp47. Para dirigir o Hsp47 no sentido de secreção na ausência de tratamento com BFA, eliminámos a sequência "RDEL" do Hsp47 numa das cópias transcritas. De acordo com este conceito, a transfecção desta cópia transcrita resulta em segregação aumentada da proteína Hsp47 e num nível (total) mais elevado de protecção das EC dos CIK do que aquele mediado pela forma essencialmente retida do retículo endoplasmático que apenas é transportada para a superfície celular através de co-transporte com

tipos de colagénio I e IV (Hughes *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 163:57-65 (1987)). Descobriu-se que a expressão de Hsp47 e de pró-colagénio I está estreitamente ligada (Clarke *et al.*, *J. Cell Biol.* 121:193-199 (1993)).

Uma clonagem adicional dirigida por PCR de *hsp47* em vectores de expressão de proteína pró e eucariótica através de marcadores de fusão eGFP-proteína permitiu à requerente efectuar uma análise FACS com cassetes de genes *hsp47* de comprimento integral e mutantes com truncagem. A análise FACS com a proteína eGFP-Hsp47 de comprimento integral corou um subconjunto de 26% de CIK maduros.

Uma análise comparativa da sequência deduzida de péptidos do gene *hsp47* humano e os dados disponíveis publicados referidos acima (Clarke, *et al.*, *Biochem Biophys Acta* 1129:246-248 (1992)) indicam a presença de pelo menos três domínios proteínicos funcionais distintos. A requerente verificou um domínio adicional apresentado neste trabalho. O Hsp47 pode ser assim representado de uma forma simplificada como uma proteína com quatro domínios (ver a Figura 15A). Através de PCR com iniciadores alternados e subsequente clonagem em vectores de expressão proteínica pró e eucariótica, foi comparada à função protectora de formas truncadas de Hsp47. Ver a Figura 15C. As truncagens foram escolhidas para eliminar fragmentos genéticos de *hsp47* de acordo com a sua estrutura presumida de domínios. Ver a Figura 15B.

Através da homologia de sequência, o Hsp47 é um inibidor da protease de serina com uma especificidade teórica para lisina no local activo de recepção de proteases de serina. As serpinas actuam

como "isco", representando substratos passíveis de clivagem que formam uma ligação covalente estável, em vez de transitória, com o centro activo das proteases de serina. Estas deixam, então, de ser libertadas, bloqueando assim o local activo da protease de serina com o qual reagiram. Assim, as serpinas inactivam as proteases de serina numa relação estequiométrica de 1:1. Apesar da relação de sequências, não foi identificada, até agora, qualquer protease de serina para o Hsp47. Alguns autores prevêem que o domínio de serpinas não seja funcional pelo facto dos aminoácidos do seu "local activo" serem modificados (Hirayoshi *et al.*, *Mol Cell Biol* 11:4036-4044 (1991)). Procedemos à mutagénese do Hsp47 numa análise de truncagem por todo o domínio de serpinas para avaliar se uma protease de serina altamente específica do conteúdo granuloso da granzima A do tipo CIK, era responsável pela função, mas a requerente não foi capaz de demonstrar uma função do Hsp47 como um inibidor irreversível de granzimas de ataque em ensaios de esterase BLT ou variação de gel SDS-PAGE (dados não apresentados). Os dados da requerente são apoiados por trabalhos com Hsp47 murino purificado que não foi capaz de inibir as principais proteases de serina em ensaios de esterase BLT *in vitro* (Davids *et al.*, *Bioorganic Chemistry* 23:437-438 (1995)). Em ensaios de libertação de ⁵¹Cr, a eliminação do domínio de serpinas deu origem a uma perda de função dos mutantes de truncagem afectados. Contudo, dado que eliminações complementares da função total restabelecida do gene para mutantes do Hsp47 truncados mais pequenos, expressando, então, pouco mais do que a região de consenso H1,A-A2 discutida adiante, assumimos que a perda de função da truncagem no terminal C do domínio de serpinas do Hsp47 dá origem a uma alteração

conformacional na proteína, que normaliza com truncagens complementares.

O segundo domínio é o sinal curto de retenção do ER "RDEL" no terminal C que foi debatida anteriormente.

O terceiro domínio é o domínio de ligação de colagénio/RGD funcionalmente evidente. Até agora, não foi directamente localizado. A truncagem dos 32 aminoácidos do terminal C ou dos 34 aminoácidos do terminal N de Hsp47 murino reduziu de forma notória a actividade de ligação de gelatina do mHsp47 (Davids *et al.*, *Bioorganic Chemistry* 23:437-438 (1995)). Todavia, actualmente ainda não é claro se estes efeitos são secundários a alterações conformacionais nos mutantes de truncagem do Hsp47 ou se indicam a localização exacta do domínio de ligação RGD funcional. Existe uma significativa homologia de sequência de mHsp47 com o inibidor de proteína C humana (hPCI) de ligação de colagénio cristalizado. Isto permitiu uma tentativa de modelar teoricamente a estrutura tridimensional do Hsp47 e prever um circuito de ligação RGD na extremidade do terminal C da proteína (Davids *et al.*, *Bioorganic Chemistry* 23:437-438 (1995)).

O quarto domínio contém uma extensão helicoidal alfa que se assemelha bastante à hélice α_2 flanqueadora do sulco de ligação ao péptido do domínio α_2 das proteínas HLA-A2 e MHC I associadas. Este péptido de consenso HLA-A2 foi sintetizado. Este péptido é capaz de proteger as EC de eliminação mediada por linfócitos CIK de uma forma reactiva à dosagem (Figura 12). Portanto, um domínio imunoprotector do Hsp47 contém um domínio peptídico, relativamente,

pequeno que, por si só é capaz de, e suficiente para, viabilizar a protecção das células endoteliais da eliminação restrita não MHC.

É mencionado que o Hsp47 e o péptido deduzido medeiam a protecção das células endoteliais através de um sinal “não assassino de acordo com o paradigma de MHC I e a “hipótese missing self” (Karre, *Semin Cancer Biol* 2:295-309 (1991); Karre et al., *Nature* 319:675-678 (1986); Ljunggren et al., *Immunol Today* 11:237-244 (1990)). Tal relação foi descrita para os trajectos de receptores inibidores da eliminação (KIR, *killer inhibitory receptor*) (Höglund et al., *Immunological Reviews* 155:11-28 (1997)). Parece possível que um sinal não assassino seja originado em CIK através de um contrarreceptor ainda não identificado que reconhece a presença qualitativa e/ou quantitativa do Hsp47 que acompanha o colagénio nas proximidades dos depósitos de colagénio. Tal modelo poderia permitir uma explicação mecanicista da vigilância tumoral por populações de CIK e outras populações de células NK e T activadas *in vivo*: o Hsp47 é co-segregado como um acompanhante de colagénio por todas as células que depositam activamente matriz extracelular contendo colagénios I ou IV (Brewer et al., *Embo J.* 16:7207-7216 (1997)). Este Hsp47 segregado pode ligar-se a sequências de consenso de fibronectina ubíqua (RGD) em moléculas de fibronectina, osteonectina, heparina e colagénio nas proximidades da superfície celular da célula secretória (Nakai et al., *Biochem Biophys Res Comm* 164:259-264 (1989)). Muito recentemente, foi relatado que o Hsp47 se liga a tetraspanina CD9 na superfície das células (Hebert et al., *J. Cell Biochem* 73:248-258 (1999)). As tetraspaninas são importantes moléculas de transdução de sinal da membrana envolvidas na definição do repertório dos linfócitos T

(Levy *et al.*, *Annu Rev Immunol* 16:89-109 (1998)). Foi recentemente relatado que uma tetraspanina relacionada, CD82, se liga a moléculas MHC de classe I e interfere com os sinais não assassinos mediados pelos receptores KIR dos linfócitos NK (Lagaudriere-Gesbert *et al.*, *J. Immunol* 158:2790-2797 (1997)). A ausência de um nível adequado de expressão MHC I leva à eliminação por defeito, de acordo com a "hipótese missing self" no contexto da vigilância de alvos NK. De forma semelhante, a ausência de uma produção adequada de colagénio por células metastáticas e a respectiva produção de matriz extracelular (ME) contributiva com falta de vasculatura para os seus tecidos de metástase poderiam levar a uma falta de sinal não assassino mediado pelo Hsp47 no contexto da vigilância de tumores metastáticos mediada por células CIK, NK e T.

De um modo semelhante, as camadas vasculares fisiologicamente aberrantes de tumores caracterizam-se por membranas basais elásticas e uma falta de produção normal de EM. Em indivíduos saudáveis, apenas a rede elipsóide do baço e do fígado possui EC com membranas basais elásticas. Foi divulgado que esta fixação de EC em membranas basais fisiologicamente elásticas, demonstra ter quantidades anormalmente elevadas de Hsp47 (Kasai *et al.*, *Cell Tissue Res* 281:135-141 (1995)). A maior citotoxicidade de linfócitos CIK em relação a EC confluentes recentes *versus* células endoteliais confluentes de 5 dias *in vitro* pode representar uma falta de sinal não assassino localizado de superfície do Hsp47 decorrente de uma membrana basal ainda incompletamente estabelecida após uma cultura fresca em frascos TC (Sauk *et al.*, *Biochem Biophys Res Comm* 172:135-142 (1990)). Uma teoria de sinal não assassino mediado pelo Hsp47 poderia fornecer um mecanismo para um rastreamento

in vivo mediado por linfócitos CIK de células residentes de tecido para produção de matriz extracelular e produção de colagénio. De acordo com esta teoria, a detecção e destruição de células tumorais sólidas metastáticas poderiam resultar da ausência de produção de colagénio e Hsp47 destas últimas. Um apoio adicional a este conceito advém de relatórios que indicam que o Hsp47 é regulado para baixo em células submetidas a transformação oncogénica (Clarke *et al.*, *J. Cell Biol* 121:193-199 (1993); Hirayoshi *et al.*, *Mol Cell Biol* 11:4036-4044 (1991)). Em estudos *in vivo*, comparando uma ampla gama de tumores sólidos, foi também verificado que o Hsp47 se torna cada vez menos expresso à medida que os tumores se tornam mais malignos e foi sugerido o rastreio dos níveis de Hsp47, no sentido de acompanhar clinicamente a progressão dos tumores em doentes com cancro (Morino *et al.*, *In Vivo* 8:285-288 (1994)). Nódulos tumorais metastáticos e o perímetro à sua volta privado de Hsp47 poderiam assim representar excelentes alvos para a vigilância celular de tumores *in vivo*. As EC que revestem a membrana basal elástica apenas verificadas em vasculatura neoangiogénica de tumores representam por si só um alvo adicional, levando a ataque específico e subsequente necrose da vascularização do tumor. Os resultados da requerente com linfócitos CIK em melanoma SCID/hu são totalmente coerentes com esta teoria.

Os anticorpos de bloqueio para KiR ou p40 não reforçam a eliminação do tumor ou alvos endoteliais. Todavia, continua a ser possível, o envolvimento de outros receptores inibidores de eliminação.

Estudos anteriores demonstraram por análise FACS que > 95% dos linfócitos CIK produzidos em grande volume expressam CD3, TcR α/β > TcR γ/δ e CD8 > CD4 (Lu et al., *J. Immunol* 153:1687-1696 (1994)). Os estudos sobre anticorpos de bloqueio demonstram que nenhuma destas moléculas está funcionalmente envolvida na citotoxicidade contra EC ou alvos tumorais (Quadro 2).

QUADRO 2

Estudos de Bloqueio de Citotoxicidade de Linfócitos CIK COM
Anticorpos Monoclonais

Classe molecular:	Anticorpo contra:		> 15% de redução da lise de células endoteliais	> 15% de redução da lise tumoral
Controlo	Isótipo Irrelevante		-	-
MHC	MHC I (W6/32)		-	-
Marcadores de Linfócitos T:	TCR α/β		-	-
	TCR γ/δ		-	-
	CD 2 (LFA-2)		-	-
	CD 4		-	-
	CD 8		-	-
Marcadores de Linfócitos NK:	CD 16		-	-
	CD 56		-	-
	p40 (via MAb NKTA 255)		-	-
	NKB1-Kir (via		-	-

(continuação)

Classe molecular:	Anticorpo contra:	> 15% de redução da lise de células endoteliais	> 15% de redução da lise tumoral
MAB DX 9)			
Moléculas de adesão celular, integrinas $\beta 2$	ICAM-1 (CD 54)	-	+
	LFA-1 (CD 18/11a)	-	+
	CD 18 (cadeia β de LFA-1)	-	+
	CD 11a (cadeia α de LFA-1)	-	-
	CD 11b (cadeia α de Mac-1)	-	-
	CD 11c (cadeia α de CR 4)	-	-
Outros CAM	CD 34	-	-
	PECAM-1 (CD 31)	-	-
	VAP-1	-	-
	N-Caderina	-	-

Anticorpos monoclonais NK-B 1 e NKp40 de bloqueio foram também testados em ensaios de citotoxicidade com libertação de ^{51}Cr . Não foi demonstrado envolvimento funcional de qualquer das moléculas na

citotoxicidade mediada por CIK em relação a alvos tumorais. Estes receptores foram ensaiados porque foi divulgado que a expressão destes marcadores NK ocorre em células T citotóxicas restritas de MHC I não clássicos (D'Andrea et al., *J. Immunol* 155:2306-2310 (1995); Gumperz et al., *J. Exp. Med.* 181:1133-1144 (1995); Lanier et al., *J. Immunol* 153:2417-2428 (1994); Lanier et al., *Immunol Today* 17:86-91 (1996); Phillips et al., *Immunity* 5:163-172 (1996); Raulet et al., *Cell* 82:697-700 (1995); Soderstrom et al., *J. Immunol* 159:1072-1075 (1997)).

Os CIK podem ser utilizados *in vivo* sem co-injecção de IL-2 (Lu et al., *J. Immunol* 153:1687-1696 (1994)). Isto representa uma diferença significativa em relação ao tratamento anterior e actual de doentes com células CD56⁺ activadas por IL-2 e apenas IL-2 (Yang, *Cancer* 76:687-694 (1995)) ou uma combinação das mesmas (Phillips, *Journal of Clinical Oncology* 5:1933-194 (1987)). Ao passo que as últimas abordagens relataram um risco considerável de desenvolvimento de síndrome de fuga vascular (VLS), potencialmente fatal, não foi observada VLS nos modelos de depuração de tumores *in vivo* com ratinhos SCID/hu. Também não se verificaram infiltrações significativas de CIK em pele humana normal enxertada.

A expansão fiável e produção de actividade anti-tumoral altamente específica é uma condição *sine qua non* para qualquer produção adoptiva de células imunoterapêuticas para utilização clínica. Uma estimulação hormonal do tipo Th₁ de elevada dosagem de células T α/β com IFN- γ , OKT-3 e IL-2 resulta em células CIK AI com citotoxicidade superior contra alvos tumorais sólidos e hematopoiéticos malignos. A utilização de biorreactores agitados

por turbina demonstra ser uma vantagem, resultando numa expansão rápida, segura e melhorada do subconjunto citolítico CD3⁺56⁺. Obtêm-se regularmente rendimentos de 10¹¹ células a partir de uma única origem de camada leucocitária. Este é um número suficiente de células efectoras para programas de tratamento de elevada dosagem e/ou repetidos na sua aplicação clínica. Os CIK podem ser produzidos a partir de origens puras de células T, mantidas em culturas a longo prazo, criopreservados e aplicados *in vitro* e *in vivo* sem co-administração de IL-2. Estas características fazem dos CIK escolhas superiores para imunoterapia adoptiva de cancro, em comparação com derivados LAK de linfócitos NK.

Exemplo 1

Cultura de linfócitos *in vitro*

Formação e Manutenção de Células CIK:

Sangue venoso total proveniente de dadores saudáveis da comunidade, sangue de cordão umbilical e camadas leucocitárias obtidas pelo Stanford Blood Center serviram como fontes de linfócitos do sangue periférico (PBL). As células PBL foram isoladas através de centrifugação com gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia). Os PBL foram novamente suspensos em RPMI 1640 (GIBCO-BRL/Life Technologies, Grand Island, NI) contendo 50 µm de β-mercaptoetanol (ME), 100 UI de penicilina-G mL⁻¹, 100 UI de estreptomicina mL⁻¹ e 10% de soro fetal de vitela (tudo da Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO) a uma densidade de $0,5-2 \times 10^6$ células/mL. Populações enriquecidas de grandes linfócitos granulares (LGL) e células T foram obtidas através de exclusão subsequente de células aderentes a plástico e lâ-poliamida. Os LGL de origem foram cultivados numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C. A estimulação hormonal consistiu na adição de interferão gama humano recombinante (rhu g-IFN) (uma gentil cedência da Genentech, South San Francisco, CA) a 1000 UI mL⁻¹ no início do dia de cultura d0, subsequente estimulação no dia um (d1) com anticorpo monoclonal CD3 anti-humano solúvel OKT-3 (derivado de hibridomas pela American Tissue Culture Collection, Rockville, MD) a 50 ng por mL e interleucina-2 humana recombinante (rhuIL-2) (uma gentil cedência da Cetus/Chiron, Emeryville, CA) a 300-500 UI por mL. As culturas foram mantidas através de acréscimo de 50% de meio fresco e 300-500 UI de rhuIL-2 a cada 3-4 dias, durante 21 a 28 dias. A actividade lítica foi verificada em ensaios de citotoxicidade com libertação de ⁵¹Cr em relação a alvos tumorais e EC no dia 14. Uma expansão preferida do fenótipo positivo duplo de CIK CD3⁺, CD56⁺ foi observada tão cedo como o dia 10 na cultura, em que uma média de 12% - 15% das células eram duplos positivos. As culturas antecipadas de CIK poderiam ser, ainda, mais enriquecidas através de uma coluna de CD56 e esférulas magnéticas para produzir culturas com uma média de 60% de fenótipos duplos positivos CD3⁺ CD56⁺ (ver a Figura 2). Para a clonagem de células CIK de célula simples, células T foram purificadas dos LGL de origem por triagem FACS para a presença de CD3 ou CD56 e a ausência de CD16, como descrito abaixo. As células foram submetidas a uma triagem com uma densidade média de 0,6 células por poço numa placa de 96 poços e expandidos por co-cultura com CIK de alimentação autóloga, duplamente,

irradiados a $0,5 \times 10^6$ linfócitos por mL com estimulação hormonal idêntica à descrita para a cultura a granel. As células foram expandidas para mais de 2×10^6 células cada e, depois testadas em relação a citotoxicidade clonal conforme descrito abaixo.

Para a produção em grande escala de CIK de dador único, produtos de aférese de um dador saudável foram tratados como indicado acima para isolar os LGL. Os LGL foram cultivados a 37 °C com uma estimulação hormonal idêntica à indicada anteriormente, mas a uma densidade de dez vezes de $5-10 \times 10^6$ linfócitos/mL em biorreactores agitados por turbina/impulsor de 500 mL, 1000 mL (Nalgene, Rochester, NI) e 15000 mL com pO₂ e pH controlados (Chemap, Volketsvil, Suíça). A utilização de biorreactores de 15 litros permitiu uma expansão de até 3×10^{11} linfócitos a partir de um único dador, com a expansão dos linfócitos CD3⁺ CD56⁺ excedendo 600 vezes.

Cultura de EC, produção e manutenção de EC:

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC) de um único dador recém-isoladas foram uma gentil cedência dos Drs. J. Murphy e J. Alvarnas (Stanford University Div. Hematology, Stanford, CA). Células endoteliais de cordão umbilical humano de dadores agrupados foram obtidas no mercado (ATCC, Rockville, MD). As HUVEC foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos revestidos com gelatina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), placas de 6 e 24 poços (Corning, Corning, NI) em meio TC-199 ou F12-K de Ham, cada um complementado com 100 UI de penicilina-G por mL, 100

UI de estreptomicina por mL, 5 µg de heparina porcina por mL, 20% de soro fetal de vitela (tudo da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e 80 µg de agentes mitogénicos endoteliais por mL (Biomedical Technology Inc., Stoughton, MA) numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C. Ao atingir uma confluência de 90%, as HUVEC foram subcultivadas ao utilizar 0,25% de tripsina e 0,02% de EDTA em solução tampão de fosfato (PBS) livre de Ca²⁺+Mg²⁺.

A cultura de EC em esférulas microportadoras foi realizada em citoportadores esféricos em acrílico revestidos a colagénio com 90 µm e 150 µm de diâmetro (Kontes, Vineland, NJ) em meio agitado por barra de agitação magnética TC-199 ou F12K de Ham, cada um complementado com 100 UI de penicilina-G por mL, 100 UI de estreptomicina por mL, 5 µg de heparina porcina por mL e 20% de soro fetal de vitela (tudo da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e 80 µg de agentes mitogénicos endoteliais por mL (Biomedical Technology Inc., Stoughton, MA) numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C.

Formação e Manutenção de Linhagens Celulares de Alvos

Tumorais:

As linhagens celulares de tumor hematopoiético SU-DHL, OCI-Ly8, K562 e linhagens celulares de linfoblastóides AMK (uma gentil cedência do Dr. A. Krensky, Stanford University, CA) e RDL (uma gentil cedência do Dr. R. Lopez, Stanford University, CA) foram cultivadas em meio RPM 1640 (GIBCO-BRL/Life Technologies, Grand Island, NI) contendo 50 μm de β -mercaptoetanol (ME), 100 UI de penicilina-G por mL, 100 UI de estreptomicina por mL e 10% de soro fetal de vitela (tudo da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a uma densidade de $0,5-2 \times 10^6$ linfócitos por mL numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C.

As linhagens celulares de melanoma WM 9 e 1205 LU (uma gentil cedência do Dr. M. Herlyn, Wistar Institute of Anatomy and Biology, Filadélfia, PA) foram mantidas em frascos tratados de cultura de tecidos (Beckton Dickinson, San Jose, CA) em meio MCDB 153 (Life Technologies, Grand Island, NI) complementadas com 5 μg por mL de insulina e 2% de soro fetal de vitela numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C.

A luciferase citoplasmática expressando de forma constituinte a linhagem celular de carcinoma cervical HeLaluc (uma gentil cedência de C. Contag, Stanford University, Stanford, CA) foi cultivada em meio DMEM (GIBCO-BRL/Life Technologies, Grand Island, NI) contendo 50 μm de β -mercaptoetanol (ME), 100 UI de penicilina-G por mL, 100 UI de estreptomicina por mL e 10% de soro fetal de

vitela (tudo da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C.

A linhagem AJY de células CTL e a linhagem AJ específica de células alvo CTL (linfoblastóides) foram gentilmente cedidas pelo laboratório de A. Krensky (Stanford University, Stanford, CA).

Exemplo 2

Clonagem e Expressão do Gene Hsp47

Fragmentos genéticos parciais de huHsp47 derivados por RT-PCR (uma gentil cedência do Dr. Sanwal, Ontário, Canadá) foram amplificados *in vitro* e locais artificiais de clonagem introduzidos por PCR. Estes fragmentos correspondem aos nucleótidos na Figura 1. O ácido nucleico que codifica os 39 aminoácidos do Hsp47 no terminal amino (excluindo a sequência de sinal e o primeiro aminoácido da proteína madura) foi amplificado com os seguintes iniciadores: Iniciador 5' ACGTTTGGATCCAGGTGAAGA, iniciador 3' GTCCTTGCCAT. O iniciador 5' integrou um local Bam HI para facilitar a clonagem em vectores complementares. O iniciador 3' integrou um local Mlu NI para facilitar a fusão dos ácidos nucleicos de codificação da porção dos terminais amino e carboxílico da proteína. O ácido nucleico que codifica os 360 aminoácidos do terminal carboxilo foi amplificado com os seguintes iniciadores: Iniciador 5' GCAATGGCCAAGGACCAGGCAGTGGAG, iniciador 3' ATCTGAATTCCTATAACTCGTCTCGCA. O iniciador 5' integrou um local Mlu NI para facilitar a fusão das duas porções do gene

numa estrutura de leitura contínua e o iniciador 3' integrou um local Eco RI para facilitar a clonagem em vectores adicionais. Foram utilizadas condições comuns de PCR do conhecimento geral dos especialistas na técnica para amplificar os dois fragmentos a partir dos clones iniciais (ver a Figura 8). Os produtos de amplificação resultantes foram digeridos com Mlu NI, purificados e ligados entre si. O ácido nucleico resultante foi complementarmente digerido com Bam HI e Eco RI e a cassette genética do huHsp47 foi direccionalmente clonada através de técnicas normalizadas de ADN recombinante em pUC 19 (Pharmacia, Uppsala, Suécia), que foi utilizado para fins de criação de cópias transcritas. O plasmídeo resultante, pUC/huHsp47, foi amplificado numa estirpe DH5a do hospedeiro bacteriano recA (Life Technologies, NI). A sequência da cassette genética clonada foi verificada através de sequenciação fluorescente num sequenciador ABI (ABI) através polimerase de ADN T7 (Pharmacia, Uppsala, Suécia).

A cassette genética do huHsp47 foi amplificada por PCR utilizando um conjunto alternativo de iniciadores, que resulta numa cassette genética expressa BamHI-EcoRI para a expressão de proteínas bacterianas. A cassette genética expressa foi clonada no vector pGEX 4T₁ (Pharmacia, Uppsala, Suécia) que produz uma proteína de fusão GST sob o controlo do promotor laq^q indutível por IPTG e cultivada na estirpe do hospedeiro bacteriano BL21(DE3) (Stratagene, La Jolla, CA).

A expressão de proteína de fusão GST recombinante em células hospedeiras bacterianas foi induzida com 20 mM de IPTG através do promotor de lactose laq^q e as proteínas sobreexpressas foram

purificadas através de cromatografia de afinidade em sepharose 4B glutaciona (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), eluídas à temperatura ambiente com 5-20 mM de glutaciona reduzida em 50 mM de tampão Tris-HCl com um pH de 8,0, analisadas quantitativamente através de ensaio de Bradford e qualitativamente por SDS-PAGE. O tampão de eluição foi substituído com solução tampão de fosfato com um pH de 7,4 através de filtração por gel PD-10 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) antes da utilização. Quando a remoção do parceiro de fusão GST era pretendida, uma clivagem com 10 UI de trombina (Sigma, St. Louis, MO) por µg de fracção fundida de GST foi realizada durante 10 a 12 horas a 37 °C, ao utilizar um local de clivagem de trombina presente nos aminoácidos de ligação entre GST e a proteína recombinante de interesse. Normalmente, foram obtidos 5 - 10 mg da proteína de fusão de huHsp47 recombinante por 4 litros de células hospedeiras BL21(DE3) transformadas por GEX-4T-Hsp47 através de cromatografia líquida rápida de proteínas de afinidade de glutaciona. O huHsp47 purificado foi utilizado nos ensaios de citotoxicidade descritos acima com libertação de ⁵¹Cr.

Para dissecar o papel que cada domínio do huHsp47 desempenha na protecção de EC de citotoxicidade induzida por CIK, mutantes de eliminação específica de domínio do huHsp47 foram produzidos através de PCR com iniciadores aninhados com base na sequência divulgada na Figura 1 e sequências de huHsp47 anteriormente publicadas. O huHsp47 possui, pelo menos, quatro domínios funcionais distintos. Começando pelo terminal amino da proteína, são estes: um domínio de ligação de colagénio/RGD, um domínio com homologia ao domínio α-2 de moléculas de HLA-A2 humanas, um domínio de inibição da protease de serina (serpina) e um domínio RDEL de

sinal de retenção do retículo endoplasmático. Foram produzidas três eliminações específicas. A eliminação 1 removeu o domínio RDEL, a eliminação 2 removeu os domínios RDEL e de serpina e a eliminação 3 removeu os 150 aminoácidos do terminal carboxilo incluindo os domínios de serpina e RDEL. O mesmo iniciador 5' foi utilizado em reacções de PCR para produzir todos os três mutantes de eliminação. A sequência do iniciador 5' é: CGGAATTCTGGCCGAGGTGAAGAAACC. O iniciador 3' utilizado para produzir o mutante de eliminação RDEL foi o mesmo iniciador utilizado para produzir a proteína de fusão huHsp47-GFP e apresenta a sequência: AGTTCCTACTGTTCTACGACCTAGGGC. O iniciador 3' da eliminação 2 é: AACTCAACCTGTGTCTAGACCTATGGGC. O iniciador 3' da eliminação 3 é: ACGCGCTGCTCCTCCACGACCTAGGGC (ver a Figura 14). Os iniciadores 5' e 3' integraram locais de enzimas de restrição BamHI e EcoRI, respectivamente, para facilitar os passos subsequentes de clonagem. Os iniciadores 5' e 3' individuais foram misturados com o plasmídeo pUC/huHsp47 contendo a cassete genética de huHsp47 e ácidos nucleicos de codificação de cada mutante de eliminação foram amplificados por PCR em reacções separadas. Os produtos de PCR foram purificados, digeridos com BamHI e EcoRI e ligados no vector pGEX-4T₁ para criar proteínas de eliminação de huHsp47/fusão de GST para ensaios de citotoxicidade (ver abaixo) ou pEGFP-NI, que também continham o sinal de secreção mel descrito anteriormente, para criar proteínas de fusão de eGFP/eliminação de Hsp47 para actuar como sondas FACS.

Uma análise de Northern da expressão de ARN do huHsp47 foi realizada através de marcação "nick translation" $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP do ADNc do huHSP47 de comprimento integral purificado em gel de agarose como sonda e ADNc de acção beta humano (uma gentil cedência do Dr.

S. N. Cohen) como sonda de controlo interno. O ARN total foi colhido nos momentos temporais de 0 horas, 2 horas e 6 horas após o tratamento com BFA de células endoteliais. Para cada momento temporal, o ARN foi purificado, desnaturado, submetido a electroforese em gel de agarose com camada plana de formamida, transferido para nitrocelulose, pré-hibridizado, hibridizado com as sondas marcadas com ^{32}P , lavado sob condições estridentes e autoradiografado sem ecrãs intensificadores a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ através de técnicas bem conhecidas pelos especialistas na matéria (consultar Sambrook *et al.* Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Os resultados indicam que o tratamento com BFA não afecta a expressão da acção beta dos genes de gestão interna, mas este tratamento com BFA regula, por aumento, a expressão genética do huHsp47, durante o período avaliado. Ver a Figura 10. Estes dados são coerentes com o aumento observado na proteína Hsp47 observado em células tratadas com BFA e isoladas por experiências de imunoprecipitação. Ver Figura 5.

A produção livre de inibidor de protease de rhuHsp47 para ensaios de granzima A foi realizada através da cultura de bactérias BL21(DE3) transformadas livres de protease em meio NZCYM de amplificação selectiva utilizando hidrolisato ácido de caseína em vez de aminoácidos tripticos de caseína como origem de péptidos nutricionais para as bactérias hospedeiras submetidas à indução por IPTG. Para minimizar os tempos de incubação, os extractos de proteínas foram incubados em lotes em resina de glutationa e foi realizada a remoção inicial de proteínas não GST com uma abordagem

de coluna de centrifugação modificada. O resto do protocolo permaneceu inalterado e não foi utilizada trombina.

Exemplo 3

Ensaio de Citotoxicidade

Ensaio de Liberação de ^{51}Cr

As células alvo foram marcadas metabolicamente com ^{51}Cr (Dupont, New England Nuclear, Boston, MA) através da incubação de 1×10^6 células em 300 mCi de ^{51}Cr , a 37 °C durante 1 a 1,5 horas. As células marcadas foram lavadas três vezes com solução tampão de fosfato (PBS) contendo 0,1% de albumina de soro bovina. As células marcadas foram distribuídas por placas de microtitulação com 96 poços de fundo plano a uma concentração de 2×10^4 células/poço em triplicado. Foram acrescentadas células efectoras (CIK) nas proporções indicadas. Foram acrescentados Mabs antes do acréscimo dos linfócitos efectores e incubados durante 15 - 30 minutos à temperatura ambiente. O volume final da mistura de ensaio em cada poço era de 0,2 mL. Após 4 horas a 37 °C, as células foram recolhidas por centrifugação e uma alíquota do sobrenadante foi contada num contador gama (Micromedic Systems, Horsham, PA). A percentagem de liberação específica de ^{51}Cr foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Liberação } ^{51}\text{Cr} = \frac{(\text{libertação de teste}) - (\text{libertação espontânea})}{(\text{libertação máxima}) - (\text{libertação espontânea})} \times 100\%$$

A libertação espontânea foi obtida por incubação das células marcadas apenas em meio completo e a libertação máxima por tratamento das células com 1% de NP-40.

A actividade anti-tumoral de células CIK adultas e derivados de cordão umbilical foi comparada em ensaios de citotoxicidade. Os resultados de citotoxicidade das células CIK derivados de ambas as origens eram sobreponíveis em relação a linfomas de linfócitos B OCI-Ly8 e SU-DHL4/LAM53 e do alvo de leucemia mielóide K562. Ambos os conjuntos de células CIK apresentaram uma citotoxicidade marginal em relação ao melanoma WM9 *in vitro*. Ambos os conjuntos de células CIK, eram citotóxicos em relação a EC de cordão umbilical humano recém-confluentes e menos citotóxicos em relação a camadas simples de células endoteliais confluentes durante períodos mais longos de tempo (ver Figura 3).

As Figuras 3A, 3B e 3C descrevem ensaios de citotoxicidade com libertação de ^{51}Cr de 4 horas com CIK d_{21} e vários alvos. Os CIK foram derivados de PBMC por cultura em RPMI completo complementado com o seguinte: No dia d_0 : $\text{IFN-}\gamma$ a 1000 u mL^{-1} . No dia d_1 : 5 ng de OKT-3 solúvel e 500 u de IL-2 mL^{-1} . Nos dias d_5 , d_9 , d_{13} , d_{17} e d_{21} : 500 u de IL-2 mL^{-1} . Todas as células estavam numa incubadora humidificada com 5% de CO_2 a 37°C . As linhagens tumorais hematopoiéticas K562, OCI-Ly8 e SU-DHL4 foram mantidas em meio RPMI completo; a linhagem de melanoma W9 foi cultivada em meio MCDB 153 completo, complementado com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de insulina e 2% de soro fetal de vitela. As células endoteliais de cordão umbilical humano foram obtidas junto da ATCC. Foram cultivadas em placas de 24 poços revestidas com 2% de gelatina em meio TC-199 ou F12-K de Ham, cada

um complementado com 20% de soro fetal de vitela, 5 µg de heparina porcina mL⁻¹ e 80 µg de agentes mitogênicos endoteliais mL⁻¹. Foi realizada uma subcultivação triptica de rotina quando as HUVEC alcançaram mais de 80% de confluência; foram executados ensaios de libertação de ⁵¹Cr de rotina no momento temporal da recém-confluência.

A Figura 3A é um perfil de citotoxicidade de CIK adultos e de cordão umbilical. Os linfócitos CIK d₂₁ apresentam uma elevada citotoxicidade em relação a linfomas de células B OCI-Ly8 e SU-DHL4 (azul), bem como leucemia eritromielóide K562 (amarelo). Verifica-se uma citotoxicidade moderada em relação à linhagem de melanoma nodular WM9 (vermelho) e HUV-EC recém-confluentes (verde-escuro).

A Figura 3B apresenta o efeito da duração da cultura de células endoteliais após alcançar a confluência sobre a sensibilidade de células endoteliais face à lise por linfócitos CIK d₂₁: as EC recém-confluentes (verde-escuro) são lisadas muito mais facilmente do que as EC cultivadas durante mais 5 dias após ter alcançado a confluência (verde-claro).

Na Figura 3C, foram formados clones de CIK através da colocação em placa de uma média de "0,6 células por poço" de uma placa de 96 poços e depois expandidos por co-cultura com células de alimentação autóloga duplamente irradiadas a 0,5x10⁶ células mL⁻¹, e com estimulação hormonal idêntica à descrita anteriormente para culturas em grande volume. Após os clones individuais terem apresentado uma expansão superior a 2x10⁶ células cada, foram testados em relação ao perfil de toxicidade clonal a uma relação

E:A de 5:1. A especificidade alvo de CIK é determinada ao nível clonal.

Os clones expandidos de CIK de célula simples foram testados no sentido de determinar se as subpopulações de células apresentavam especificidade alvo em ensaios de citotoxicidade realizados conforme acima descrito. A especificidade alvo foi observada, apresentava especificidade de linhagem e era direccionada apenas contra células tumorais, apenas contra EC ou contra ambos os alvos, sendo a última situação a mais comum. A linhagem celular 2D10 de células CIK testada demonstrou toxicidade em relação à linhagem celular de tumor OCI-Ly8, mas não em relação à linhagem celular de HUVEC. A linhagem celular 5F7 de CIK apresentou citotoxicidade em relação a EC de cordão umbilical humano, mas não em relação a células OCI-Ly8. A linhagem celular 2C10 de CIK demonstrou ser citotóxica em relação a células OCI-Ly8 e HUVEC.

Tratamento de Alvos com BFA:

Para tratamento com brefeldina A (BFA), camadas simples de HUVEC recém-confluentes, células alvo não aderentes ou CIK a $0,5-2 \times 10^6$ células por mL foram incubados com um meio complementado com 0,5-10 μg de brefeldina A (Böhringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemanha) por mL de meio e incubadas, durante 2 a 6 horas numa incubadora humidificada com 5% de dióxido de carbono a 37 °C. A BFA foi dissolvida a 100 μg por mL em etanol a 70% e utilizada fresca ou armazenada até 4 semanas a -20 °C. Antes do ensaio de citotoxicidade, as células foram enxaguadas três vezes com solução tampão de fosfato e foi acrescentado meio fresco sem BFA para o resto do ensaio (Figura 4).

O tratamento com BFA interfere com o transporte de vesículas intracelulares desde o retículo endoplasmático até aos compartimentos proximais e intermédios de Golgi, impedindo a glicosilação de proteínas orientadas para a secreção e transporte vesicular activo de proteínas maduras para a superfície celular (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1990; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991; Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Orci *et al.*, 1991; Vogel *et al.*, 1993). O tratamento com brefeldina de células endoteliais dá origem à regulação por aumento e secreção de um inibidor de proteína com 46,5 KDa identificado actualmente como Hsp47 por imunodeteccção com anticorpo monoclonal SPA470. A Figura 5 demonstra a imunoprotecção com Mab N6 de extractos de HUVEC marcadas com biotina e ^{35}S após 6 horas de indução da BFA. Vias: M = marcador, 1 = tipo selvagem, 2 = 10 μM , 3 = μM de BFA.

A Figura 5A é um SDS-PAGE com coloração por prata, 10% de gel de poliacrilamida. A detecção específica de p46.5 ocorre apenas numa dose protectora de BFA. Observe as cadeias pesadas e leves de IgG do Mab N6.

A Figura 5B é uma autorradiografia de um SDS-PAGE com 12% de gel de poliacrilamida transferido para uma membrana NC. Uma banda de 46,5 KDa radiomarcada com ^{35}S apenas está presente com 10 μM de BFA.

A Figura 5C demonstra a identificação positiva de p46.5: Trata-se de huHsp47, por imunodeteção com anticorpo monoclonal SPA 470 específico ao Hsp47. O Hsp47 migra neste PAGE de 12% com M_r idêntico de 46500 ao péptido radiomarcado. As bandas de proteínas de p46.5 e huHsp47 são sobreponíveis. Tenha em atenção que, devido à utilização de anticorpo monoclonal de IgG N6 de ratinho para o IP e à detecção de anticorpo monoclonal SPA470 anti-Hsp47 primário de ratinho com anticorpo secundário de peroxidase de caprino anti-ratinho, as cadeias pesadas e leves do Mab N6 também são detectadas neste ensaio ECL.

O tratamento de alvos com BFA foi capaz de suprimir a lise mediada por células CIK de EC de um modo dependente da dosagem, mas não afectou a capacidade das células CIK de lisar alvos tumorais (Figura 4). As HUVEC e as células OCI-Ly8 foram incubadas com BFA em concentrações de 0, 2,5, 5, 7,5 e 10 μM durante 6 horas como descrito anteriormente, lavadas, marcadas com ^{51}Cr e utilizadas num ensaio de citotoxicidade com células CIK d_{21} a uma relação E:A de 20:1. A pré-incubação de EC alvo com 2,5 μM de BFA reduziu a

citotoxicidade mediada por CIK em 40%. Doses superiores reduziram ainda mais a citotoxicidade e uma pré-incubação em 0 μ M de BFA foi suficiente para bloquear completamente a lise mediada por linfócitos CIK de HUVEC.

Ensaio de Inibição de Citotoxicidade com Liberação de ^{51}Cr com Mab de Bloqueio:

Antes do acréscimo de células efectoras, foram acrescentados 5 μ g de anticorpo monoclonal (Mab) purificado e livre de NaN₃ por mL de meio às células alvo e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. As células efectoras foram acrescentadas directamente aos alvos tratados. O remanescente do ensaio foi realizado como detalhado anteriormente, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂.

Mab de classe MHC I (W6/32), marcadores de linfócitos T CD2 (LFA-2), CD4, CD8, TcR α/β OU γ/δ e marcadores NK CD16, CD56, NK-B1(NKTA255) e Nkp40 (DX 9) não bloqueiam a citotoxicidade de células CIK em relação a alvos tumorais e EC alvo. Anticorpos monoclonais a ICAM-1 (CD54) e LFA-1 (CD 18/11_a, cadeia β de LFA-1, cadeia α de LFA-1) bloqueiam a citotoxicidade de células CIK em relação a células tumorais, mas não EC alvo. Nenhum outro anticorpo monoclonal anti-CAM testado (cadeia α de CR 4, CD 34, CD 31, VAP-1 ou N-Caderina) bloqueou a citotoxicidade de células CIK em relação a alvos tumorais. Nenhum dos anticorpos testados bloqueou a citotoxicidade de células CIK em relação a EC alvo, indicando que

as células CIK interagem de forma diferente com alvos tumorais (ver o Quadro 2).

Ensaio de Citotoxicidade com Libertação de ^{51}Cr com Acréscimo de Proteínas e Péptidos:

Na sequência da marcação com ^{51}Cr , mas antes do acréscimo das células efectoras, 10 a 200 μg de proteína Hsp47 purificada por cromatografia líquida rápida de proteínas (Exemplo 7) ou 10 nM a 110 μM de péptido AVLSAEQLR purificado por cromatografia líquida de elevado desempenho (Exemplo 8), ambos em solução tampão de fosfato esterilizada com um pH de 7,4 e diluídos para obter a concentração final com RPMI, foram acrescentados a alvos por mL de meio e incubados, durante 30 minutos a 37 °C, numa atmosfera humidificada com 5% de CO_2 . Em ensaios com utilização de proteínas purificadas, os alvos foram submetidos a três lavagens subsequentes com 10 volumes de Ca^{2+} , Mg^{2+} e soro fetal de vitela a 5% contendo solução tampão de fosfato antes de fornecer meio fresco normalizado de cultura às células alvo. Em ensaios realizados ao utilizar péptido purificado, o péptido acrescentado manteve-se presente durante todo o ensaio. O resto do ensaio foi realizado como detalhado anteriormente, a 37 °C numa atmosfera humidificada com 5% de CO_2 .

A incubação de EC com 20 μg de huHsp47 purificado por afinidade de gelatina (descrita adiante) por 300 μL foi suficiente para proteger completamente o alvo da lise mediada por CIK (ver a Figura 7) de um modo idêntico à protecção observada com o

tratamento descrito acima com 10 μM de BFA, durante 6 horas (ver a Figura 7).

O acréscimo de uma quantidade tão reduzida como 1 nM de proteína huHsp47-GST conseguiu reduzir a lise de células endoteliais em 50%. A pré-incubação com 10 μM de proteína huHsp47-GST protege completamente as EC de lise mediada por CIK (ver a Figura 9). O péptido AVLSAEQLR também conseguiu proteger as EC de lise mediada por linfócitos CIK de um modo dependente da dosagem em ensaios onde a relação E:A era de 20:1 (ver a Figura 12). O péptido a uma concentração de 1 μM conseguiu reduzir a lise de EC em 50% e péptido a uma concentração de 10 μM conseguiu suprimir quase totalmente a lise mediada por CIK. O péptido foi capaz de reduzir a lise de alvos específicos em menos de 10% quando utilizado a 10 μM num ensaio de citotoxicidade com ^{51}Cr de células tumorais CIK-OCI-Ly8 com uma relação E:A de 20:1.

Os efeitos protectores de cada mutante de eliminação de huHsp47 (Fig. 15B) também foram analisados. Ver a Fig. 15C. A proteína mutante de eliminação 1, sem o domínio RDEL, reduziu a lise mediada por CIK em 40%, indicando que o domínio RDEL não está envolvido na protecção das EC de citotoxicidade. A proteína mutante de eliminação 2, sem os domínios de serpinas e RDEL, apenas reduziu a lise mediada por CIK em 20%, sugerindo que o domínio de serpinas está envolvido na protecção de EC contra a citotoxicidade ou que a proteína resultante apresenta uma estrutura aberrante, resultando numa forma menos activa da proteína. A proteína mutante de eliminação 3, sem os 150 aminoácidos do terminal carboxilo, demonstrou ser tão eficaz como a proteína mutante de eliminação 1

na protecção de EC de lise mediada por CIK, sugerindo que a protecção reduzida observada com a proteína mutante de eliminação 2 se deve a uma conformação alterada da proteína e não ao facto de o domínio de serpinas participar na protecção. A proteína mutante de eliminação 3 retém o domínio de ligação de colagénio/RGD e o domínio de homologia α 2-HLA-A2, que contém a sequência peptídica AVLSAEQLR.

Protecção de Células Endoteliais por Transfecção com um Vector de Expressão de Proteína do HSp47

Ácidos nucleicos de codificação do huHsp47 e fragmentos foram clonados em vectores de expressão eucariótica. Um ácido nucleico de codificação de um fragmento de huHsp47, no qual a sequência de aminoácidos RDEL do terminal carboxilo foi eliminada, foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pUC/huHsp47 ao utilizar os seguintes iniciadores: iniciador 5' CGGAATTCTGGCCGAGGTGAAGAAACC, iniciador 3' AGTTCCCACTGTTCTACGACCTAGGGC. O produto amplificado foi ligado ao sinal de secreção de melitina e sequências de Kozak derivadas do pMel-Bac (Invitrogen, San Diego, CA) e o fragmento resultante foi clonado no local de clonagem múltipla de 15 pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) ao utilizar técnicas gerais bem conhecidas pelos especialistas na matéria. O plasmídeo resultante, eGFP-Hsp47, foi transfectado para células endoteliais.

Ácidos nucleicos que codificam de huHsp47 de comprimento integral e huHsp47 δ RDEL foram clonados no pBK-CMV (Stratagene, La Jolla, CA) e expressos em EC. O vector pBK foi digerido com Nhe I e

EcoRI para remover o promotor Lac, a maioria do GCP (germe celular principal) e uma porção do gene Lac Z. O péptido de sinal de secreção de melitina e a sequência de Kozak foram amplificados por PCR a partir do vector pMel-Bac conforme acima descrito e ligados no vector pBK de forma adjacente ao promotor CMV IE. Cassetes de genes de codificação de huHsp47 de comprimento integral ou huHsp47 δ RDEL foram ligadas no vector pBK de forma adjacente à sequência de sinal de mel e os vectores resultantes foram utilizados para transformar células endoteliais. Os vectores CMV-neo-mel-huHsp47 de comprimento integral e CMV-neo-mel-huHsp47 δ RDEL foram purificados das culturas de células hospedeiras contendo cada vector e utilizados para transfectar EC ao utilizar um protocolo de transfecção de lipofectamina de baixa dosagem (GIBCO/BRL, NI). As EC transfectadas foram depois analisadas em ensaios de citotoxicidade de CIK.

As EC foram também co-transfectadas com uma combinação de vectores: eGFP-Hsp47, CMV-neo-mel-huHsp47 de comprimento integral e pCMV-CD20 (um vector que exprime CD-20 sob o controlo do promotor CMV, uma gentil cedência do Dr. S. vHeuvel, Massachusetts General Hospital, Boston, MA) ao utilizar o protocolo de transfecção de lipofectamina de baixa dosagem. As células foram submetidas a análise FACS 24 horas após a co-transfecção.

As EC alvo foram utilizadas em ensaios de citotoxicidade 24 horas após a transfecção mediada por lipofectamina de CMV-neo-mel-huHsp47 de comprimento integral ou CMV-neo-mel-huHsp47 δ RDEL em EC anteriormente susceptíveis. Células CIK d₂₁ maduras foram utilizadas numa relação E:A de 20:1. As EC com sobreexpressão de

huHsp47 de comprimento integral apresentaram uma redução de 25% na lise mediada por CIK. As EC com sobreexpressão de huHsp47 δ RDEL demonstraram ser totalmente resistentes à lise mediada por CIK (ver Figura 11). A eliminação do péptido RDEL, que actua como um sinal de retenção do retículo endoplasmático (ER), de 10 huHsp47, permite que a proteína seja livremente segregada e protege as EC alvo que expressam a proteína da lise mediada por CIK.

Exemplo 4

Triagem e Imagiologia de Células Activada por Fluorescência

Para a triagem de células activada por fluorescência (FACS), 10^6 células efectoras ou alvo foram lavadas duas vezes com Ca^{2+} , Mg^{2+} e 5% de soro fetal de vitela contendo solução tampão de fosfato, suspensas em 50 μ L deste tampão e colocadas a uma temperatura de 0-4 °C num local escuro. 1 μ g de anticorpo monoclonal marcado com FITC, PE, Per-CP ou TriColor (Beckton Dickinson, San Jose, CA) por reacção de coloração de 10^6 células foi misturado com as células e incubado durante 15 a 30 minutos a 0-4 °C no escuro. As células coradas foram submetidas a três lavagens subsequentes com 10 volumes de Ca^{2+} , Mg^{2+} e 5% de soro fetal de vitela contendo solução tampão de fosfato e recolhidas em 500 μ L deste tampão para análise ou triagem por FACScan/FACStar (Beckton Dickinson, San Jose, CA) com excitação a 488 nm e os filtros apropriados de canal para a detecção de emissão.

A coloração de células para microscopia de imunofluorescência foi realizada de uma forma semelhante e as células coradas foram analisadas com um sistema de câmara de fluorescência Axiophot (Zeiss, Hanau, Alemanha).

A proteína de fusão huHsp47 δ RDEL-proteína fluorescente verde realçada (eGFP), expressa sob o controlo do promotor CMV IE, foi isolada conforme acima descrito e utilizada como uma sonda FACS para procurar proteínas de ligação à superfície celular de huHsp47. A análise FACS de CIK d₂₁ maduros com rhuHsp47 marcado com eGFP como sonda molecular foi realizada através da coloração inicial com PE-Mab e especificamente PE-CD56, se pretendido, seguida da suspensão dos CIK lavados em 10 μ g de eGFP-huHsp47 por mL de solução tampão de fosfato, incubação durante 15 minutos a 4 °C no escuro e remoção da proteína não ligada por centrifugação num centrifugador refrigerado Eppendorf a 1000 rpm a uma temperatura de 0-4 °C. Pastilhas de células coradas foram novamente suspensas em 500-1000 μ L de solução tampão de fosfato, imediatamente, antes da análise FACS ou suspensas em fixador de solução tampão de fosfato contendo 3% (p/v) de formaldeído antes da análise. Após a coloração, as células foram triadas ao utilizar o canal FITC. 26% das células analisadas demonstraram ser positivas a sondas eGFP-huHsp47 e PE-CD56, indicando que um subconjunto distinto das células CIK tinha receptores para o huHsp47.

As EC co-transfectadas com eGFP-Hsp47, CMV-neo-mel-huHsp47 de comprimento integral e pCMV-CD20 utilizando o protocolo de transfecção de lipofectamina de baixa dosagem foram analisadas 24 horas após a co-transfecção. As células foram coradas com anticorpo

monoclonal PE-CD20 e analisadas em relação à presença do antígeno CD-20 e do eGFP-Hsp47 ao utilizar o canal FITC. Mais de 79% das células revelaram ser positivas a ambas as sondas, indicando que se verificou uma eficiência de transfecção extremamente elevada.

Exemplo 5

Purificação e Análise de Proteínas Nativas

Extracto de Proteínas de Células Alvo

Antes da colheita de células, alvos foram cultivados ou tratados com BFA conforme descrito acima e as células mortas removidas das camadas simples de EC por lavagens com Ca^{2+} , Mg^{2+} contendo solução tampão de fosfato, de alvos não aderentes através de centrifugação com gradiente de densidade. A lise de células foi efectuada através de fraccionamento celular ultra-sónico (Branson, New Brunswick, NJ) em solução tampão de fosfato contendo 1% de Triton-X 100 (Tx-100, Sigma, St. Louis, MO) e cocktail completo de inibidor de protease (Böhringer Mannheim, Mannheim, Alemanha).

Para marcação metabólica com ^{35}S metionina/cisteína, as células foram cultivadas durante 22 horas em meio RPMI 1640 ou F12K de Ham (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) sem metionina e cisteína com soro fetal de vitela dialisado, e depois como descrito acima, antes da adição de $100 \mu\text{Ci mL}^{-1}$ de ^{35}S metionina/cisteína Translabel (PIERCE/Amersham, Amersham, Reino Unido) no início do tratamento de controlo com BFA e incubadas durante os tempos

indicados. As proteínas marcadas para análise “pulse-chase” foram analisadas através de SDS-PAGE, análise de Western ou autorradiografia e coloração por prata.

A marcação de proteínas de membrana por biotinylação foi realizada após tratamentos aplicáveis com BFA e subsequente remoção estridente de células mortas. Análogos de biotina modificados com braços de ligação de 23 átomos solúveis em água e insolúveis em lípidos NHS-SS-biotina e NHS-LC-biotina (PIERCE, Rockford, IL) foram acrescentados a um final de 1 mg mL⁻¹ de solução tampão de fosfato e as camadas simples de células incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida através da remoção da reação de marcação com biotina e três lavagens com 10 volumes de 100 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl, 5 mM de tampão EDTA com um pH de 7,4, fornecendo excesso de amina para reagir com grupos NHS residuais.

A purificação de proteínas biotiniladas NHS-SS-biotina foi realizada através de cromatografia de afinidade numa resina de estreptavidina imobilizada em 6% de agarose com ligação transversal (Sigma, St. Louis, MO) sob controlo de UV260nm (Pharmacia, Uppsala, Suécia). As proteínas ligadas foram libertadas da matriz de estreptavidina ao clivar a ligação dissulfureto do braço de ligação SS-biotina com 23 átomos com 100 mM de β-mercaptoetanol: Isto resulta na eluição da proteína anteriormente marcada com biotina, deixando a fracção de biotina ligada à resina de estreptavidina. As proteínas especificamente eluídas foram analisadas por SDS-PAGE, autorradiografia e coloração por prata. A detecção de proteínas biotiniladas NHS-LC foi realizada por SDS-PAGE, transferência

subsequente para membranas de suporte sólido e reacção com estreptavidina-fosfatase alcalina (FA). A estreptavidina-fosfatase alcalina ligada foi detectada através de ensaio colorimétrico BCIP/NBT. Foi realizada uma autorradiografia subsequente com extractos metabolicamente marcados com ^{35}S metionina/cisteína.

Exemplo 6

Formação e Preparação de Anticorpos

Formação e Preparação de Anticorpos Policlonais:

A formação de antissoros policlonais de coelho foi realizada após a colheita de soro não imune/pré-soro de três coelhos fêmea da Nova Zelândia. Foi utilizado um mg de proteína total por dia de imunização e por animal. Foram utilizadas como antígenos preparações de membrana de células alvo linfoblastóides de tipo selvagem derivadas de ultracentrifugação e tratadas com TM. Os antígenos foram preparados como emulsão em adjuvante completo de Freud (FCA, Sigma, St. Louis, MO) e injectados por via subcutânea. Isto foi seguido por três imunizações de reforço a intervalos de seis semanas conforme acima indicado, mas substituindo o FCA por adjuvante incompleto de Freud (FIA). O desenvolvimento da titulação foi vigiado por ensaio de pigmentação de antígeno de amostras de sangue colhidas em veias da orelha dos coelhos obtidas nos instantes dos reforços. O soro foi separado do produto celular da amostra colhida através de coagulação e subsequente centrifugação, aspirado e armazenado congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser utilizado.

Preparação de Anticorpos Monoclonais:

A produção limitada de Mab N6 *in vivo*: Hibridoma de Mab N6 de proteína pan-anticoque térmico (uma gentil cedência do Dr. K. Nagata, Quioto, Japão) foi injectado por via intraperitoneal em ratinhos fêmea Balb/c com seis semanas. O líquido ascítico foi colhido, congelado instantaneamente em N2 líquido e armazenado a -20 °C até ser necessário.

Purificação de Anticorpos:

A purificação por cromatografia líquida rápida de proteínas de anticorpos policlonais e monoclonais a partir de soro ou líquido ascítico foi realizada após uma diluição de 7x em PBS e cromatografia sobre Proteína A sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suécia) com controlo de UV260nm. Fracções de Ig ligadas foram eluídas com 25 mM de tampão de glicina com um pH de 2,5 e rapidamente tituladas de volta para um pH de 7,4 através do acréscimo de base TRIZMA (Sigma, St. Louis, MO). As quantidades de proteína foram determinadas por ensaio de Bradford a 595 nm num espectrofotómetro DU-650 (Beckman, Palo Alto, CA).

Foi efectuada uma imunoprecipitação ao preparar primeiro complexos imunes pré-formados da seguinte forma: Anticorpo monoclonal de ratinho ou policlonal de coelho específico purificado foi incubado numa relação estequiométrica com anticorpo de cabra

secundário purificado anti-ratinho ou anti-coelho a uma concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 1% (p/v) de NP40, com pH de 7,8, com agitação suave durante, 3 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Numa reacção separada, os anticorpos de controlo correspondidos com o seu isótipo respectivo foram associados a esférulas de proteína A sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Os complexos imunes formados foram colhidos por centrifugação a 13000 rpm num centrifugador refrigerado Eppendorf (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), durante 15 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, lavados duas vezes com um volume de 500 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, 2% de BSA, 0,25% (p/v) de SDS, 0,5% (p/v) de Tx-100, pH 7,5, e recolhidos em $120 \mu\text{l}$ de 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl e 1% (p/v) de NP40 com pH de 7,8. Para a extracção de proteínas, 2×10^7 células por mL de tampão foram lisados por aplicação de ultra-sons em 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 1% (p/v) de NP40, 1 mM de PMSF, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de inibidor de tripsina e 5 mM de EDTA com pH de 7,8. Os detritos de células foram retirados por centrifugação a 13.000 rpm durante 30 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O lisado foi clarificado com os anticorpos de controlo correspondidos com o isótipo associados a esférulas de proteína A sepharose por agitação, durante 3 horas, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e subsequente remoção das esférulas por centrifugação a 13000 rpm durante, 15 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Foi realizada uma imunoprecipitação com anticorpo específico ao acrescentar $30 \mu\text{l}$ do extracto clarificado de proteína a $200 \mu\text{l}$ de 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 1% (p/v) de NP40, com pH de 7,8 e incubando com $10 \mu\text{l}$ dos complexos imunes pré-formados específicos por reacção com agitação suave durante 3 horas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O precipitado imune específico foi recuperado por centrifugação a 13.000 rpm durante, 30 minutos, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, lavado duas vezes com 10 mM de Tris-HCl com pH de 6,8 e

analisado através de SDS-PAGE e subsequente coloração por prata, transferência para suporte sólido e detecção por estreptavidina/AP e autorradiografia.

Os alvos AMK foram tratados inicialmente, durante 16 horas, com TM a 5 µg por mL ou deixados sem tratamento e, depois, tratados paralelamente com BFA e ³⁵S met/cis (na presença de TM no grupo inicialmente tratado), conforme descrito acima, seguidos por uma exploração, durante 2 horas. Os extractos de células em bruto foram imunoprecipitados (IP) com antissoros policlonais preparados contra as preparações de membrana AMK acima descritas ou com Mab N6 de proteína pan-antichoque térmico. Autorradiografias dos IP separados por SDS-PAGE com qualquer dos anticorpos da proteína celular total, mostram a presença de uma proteína de 46,5 KDa marcada com ³⁵S nas células linfoblastóides não tratadas resistentes a CIK que estava ausente nas células tratadas com TM.

As EC alvo foram cultivadas sem presença de BFA, na presença da dose protectora de 10 µM de BFA ou na presença da dose não protectora de 30 µM de BFA paralelamente com ³⁵S met/cis, conforme descrito anteriormente. As amostras foram processadas conforme descrito para as células AMK. As EC alvo cultivadas na presença de BFA também continham uma proteína de 46,5 KDa marcada com ³⁵S. Esta proteína não era detectável no IP das EC cultivadas sem BFA ou com a dose não protectora de 30 µM de BFA (ver a Figura 5).

Esta proteína de 46,5 KDa foi identificada como Hsp47 numa análise de Western utilizando o anticorpo monoclonal SPA-470. Extractos de HUVEC marcadas com ³⁵S preparados a partir de células

tratadas com BFA, descritas acima, foram imunoprecipitados conforme descrito ao usar o anticorpo monoclonal pan-antichoque térmico N6. Os precipitados foram submetidos a um SDS-PAGE a 12%, transferidos para membrana NC, bloqueados e sujeitos a reacção com o anticorpo SPA-470 ao utilizar técnicas bem conhecidas dos especialistas. A presença do anticorpo SPA-470 ligado à proteína de 46,5 KDa e a presença das cadeias pesadas e leves de N6 foram detectadas ao utilizar um ensaio de coloração peroxidase de rábano-silvestre (ECL) de cabra anti-ratinho.

A biotinilação de EC aderentes vivas com o análogo de biotina solúvel em água e insolúvel em lípidos NHS-LC-biotina efectuada conforme descrito anteriormente, seguida por IP de extractos de células utilizando o anticorpo policlonal anti-AMK ou Mab N6 e subsequente SDS-PAGE, transferência para membrana NC e detecção, utilizando um sistema de estreptavidina-fosfatase alcalina demonstrou que a proteína Hsp47 induzida por tratamento com BFA e uma proteína menor de 27 KDa estão localizadas na superfície celular de EC alvo.

Exemplo 7

Purificação e Análise de Proteínas Hsp47

A purificação de proteínas nativas e recombinantes foi efectuada ao submeter extractos de proteínas em bruto a cromatografia líquida rápida de proteínas de permuta de aniões em Q-sepharose® com um pH de 7,4, e um pH de 6,8, da eluição das

fracções separadas através do aumento da força iónica e subsequente cromatografia líquida rápida de proteínas de exclusão de tamanho em fracções de separação Superose 12 com volumes crescentes de eluição V_e , controlada por um monitor UV-M de 214, 260 e 280 nm e registada no modo analógico (todos os equipamentos e resinas: Pharmacia, Uppsala, Suécia) (ver a Figura 6). As quantidades de proteínas foram quantificadas online por integração na técnica sob o pico de absorvância (AuP) registado e por ensaio de Bradford das fracções analisadas. Foi realizada uma análise qualitativa por SDS-PAGE e subsequente coloração por Coomassie e por prata, bem como transferência de membrana e Transferência de Western, nos casos em que estavam disponíveis anticorpos específicos.

A Figura 6A é um perfil $UV_{260\text{ nm}}$ da purificação de Hsp47 nativo de células endoteliais em resina de permuta de aniões Q-sepharose com pH de 8,9. 175 frascos de HUVEC confluentes foram induzidos com 10 μM de BFA, conforme descrito. No primeiro passo da purificação com permuta de iões, as proteínas foram separadas com a mesma resina com um pH de 7,4 e as fracções contendo hsp47 foram agrupadas. Subsequentemente, as proteínas foram diluídas cinco vezes em tampão com baixo teor salino com um pH de 8,9 para produzir tampão A (75 mM de $\text{Tris}\cdot\text{Cl}$ com pH de 8,9, 175 mM de NaCl, 2 mM de DTT, 0,5 mM de EDTA, 2 mM de PMSF) e carregadas na coluna de permuta de iões. As proteínas ligadas foram submetidas a um gradiente salino linear com tampão B = A + 100 mM de NaCl. A separação de picos de proteínas individuais foi melhorada através de níveis incrementais de concentração salina manualmente alterados, com base na extinção OD.

A Figura 6B é uma análise SDS-PAGE a 12% com coloração por prata das fracções contendo p46,5 recolhidas. Estas foram agrupadas e concentradas através de membrana YD10 para 1,0 mL.

A Figura 6C é uma análise SDS-PAGE a 12% com coloração por prata da fracção contendo p46,5 recolhida após cromatografia líquida rápida de proteínas de exclusão de tamanho em Superose 12. Rendimento: 240 µg.

Foi realizada uma cromatografia líquida rápida de proteínas de afinidade ao carregar extractos de proteínas de EC de tipo selvagem e tratadas com BFA em matriz de gelatina-sepharose (Pharmacia, Uppsala, Suécia) com a ajuda de uma bomba peristáltica e incubando o extracto, durante 30 minutos, a 0-4 °C. As proteínas não ligadas e ligadas sem especificidade foram retiradas através de lavagem com 7 volumes de coluna de tampão com elevado teor salino, seguida por tampão original de extracção de proteínas até a detecção UV260nm a AU 0,02 regressar à linha de referência. Uma eluição com pH específico foi realizada com solução tampão de fosfato com um pH de 5,5; eluentes alternativos incluíam 100 mM de ATP em PBS e 100 µM de péptido RGD em PBS, ambos com um pH de 7,4.

Foi realizada uma cromatografia líquida rápida de proteínas de imunoafinidade de modo semelhante, com o extracto de proteínas carregado numa coluna de Mab específico: 10 mg de Mab N6 purificado foram associados através de um ligante de tioéter covalente com um braço de espaçamento de 13 átomos a agarose activada com ligação transversal através do protocolo Sulfolink (Pierce, Rockford, IL). As proteínas ligadas sem especificidade, foram retiradas das

colunas como mencionado anteriormente e as proteínas com imunoreconhecimento específico foram eluídas através de eluição com um pH de 2,5 em tampão de 50 mM de Na^{*}citrato.

O Hsp47 pode também ser sujeito a purificação por afinidade de gelatina. 175 frascos de HUVEC confluentes foram induzidos com 10 μ M de BFA durante 6 horas a 37 °C, com 5% de Co₂, em meio F12K complementado com 20% de soro fetal de vitela e suplementos comuns de cultura de células endoteliais. Subsequentemente, as células endoteliais aderentes foram colhidas por raspagem em tampão detergente (75 mM de Tris•Cl, 175 mM de NaCl, 2 mM de DTT, 0,5 mM de EDTA, 0,5% de Tx-100, 2 mM de PMSF), lisadas por aplicação de ultra-sons e o extracto limpo de detritos de células por centrifugação a 15000 rpm num centrifugador refrigerado Eppendorf. O extracto limpo foi carregado numa coluna de 5 mL de gelatina 4B Sepharose de associação covalente através de bomba peristáltica a 0,5 mL min⁻¹. As proteínas não ligadas foram eliminadas. A coluna foi, então, lavada com tampão sem detergente (como anteriormente, sem Tx-100), tampão com baixo teor salino (sem NaCl) e tampão com elevado teor salino (mais 500 mM de NaCl) com controlo UV_{260nm} até serem obtidas leituras de referência. A eluição específica de Hsp47 foi obtida ao baixar o pH do tampão sem detergente para um pH de 4,8. O eluato recolhido foi imediatamente titulado de volta para um pH de 7,4. A coluna foi imediatamente regenerada e lavada com tampão com um pH de 7,4.

A Figura 2 mostra os resultados de incubação de EC com Hsp47 purificado por afinidade de gelatina durante 30 minutos a 21 °C, antes do ensaio de citotoxicidade de linfócitos CIK com libertação

de ^{51}Cr . A proteína Hsp47 não ligada em excesso foi retirada dos poços através de três lavagens antes do acréscimo de células efectoras CIK. Como controlo, células endoteliais de cordão umbilical humano alvo induzidas por BFA não tratadas foram comparadas com o grupo de tratamento pela proteína. O Hsp47 humano, a proteína de 46,5 KDa purificada por eluição com pH específico a partir de matriz de gelatina, protege as EC.

Exemplo 8

Péptidos Hsp47

Síntese do Péptido

Um péptido 9 mer hidrofílico da sequência AVLSAEQLR que corresponde à região de homologia partilhada do Hsp47 com HLA-A2 foi sintetizado pelo centro PAN de Stanford num sintetizador de péptidos BioApplied®, purificado por cromatografia líquida de elevado desempenho e verificado através de sequenciação de aminoácidos. Péptido puro foi liofilizado e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O péptido era solúvel em solução aquosa e foi utilizado em solução tampão de fosfato e RPMI 1640 nas concentrações indicadas.

A sequenciação de aminoácidos do p46 nativo purificado e fragmentos proteolíticos derivados do mesmo foi realizada por A. Willis (Unidade de Imunoquímica do MRC, Universidade de Oxford, Oxford, Reino Unido).

Exemplo 9

Análise *In vivo*

Modelo SCID/hu de Depuração de Tumores por Enxerto de Pele/Melanoma/CIK

Ratinhos fêmea Balbc/SCID com 6 semanas de idade foram irradiados com 500 Rads no dia anterior aos enxertos de pele. Enxertos de prepúcio humano de espessura total foram preparados ao expor assepticamente as suas camadas vasculares subcutâneas e aparando as suas margens para obter um enxerto de 20 x 30 mm. Os prepúcios rendendo apenas enxertos mais pequenos ou com mais de 24 horas de tempo de armazenamento foram rejeitados. Animais anestesiados foram preparados num ambiente operatório aquecido a 37 °C ao rapar assepticamente áreas correspondentes nos seus flancos. Os enxertos de pele de espessura total foram colocados com sutura absorvível interrompida, cobertos assepticamente com ligaduras e os animais enxertados, alojados em separado até que o enxerto completo fosse evidente. Após o enxerto, 1×10^5 células WN9 ou 1205 LU de melanoma em solução tampão de fosfato foram injectadas por via intradérmica num único local da pele humana de espessura total de animais em triplicado e o desenvolvimento do tumor vigiado por observação e palpação. Animais com massa de tumor nodular evidente com um diâmetro superior a 5 mm foram injectados por via intraperitoneal com 1×10^7 CIK células (suspensas em RPMI sem soro fetal de vitela ou IL-2) de actividade lítica comprovada no mesmo dia do ensaio de citotoxicidade com libertação de ^{51}Cr do

dia de cultura de células CIK d14-21. Os animais foram sacrificados 0, 24, 48 e 72 horas após a injeção de células CIK e os órgãos internos e o enxerto de pele humana/melanoma fixos separadamente e analisados por microscopia de luz de secções tecidulares coradas com H&E e imunoperoxidase em relação a antígenos CD3 anti-humanos, PE-CAM humanos e Kir humanos. As células CIK injectados de IP infiltraram-se selectivamente nas camadas vasculares do tumor de melanoma, o que foi confirmado por imunodeteção histológica IPOX utilizando Mab PE-CAM anti-humano. Excluindo uma infiltração ligeira na área de portal do fígado de ratinho, a vasculatura e o tecido dérmico do enxerto de pele humana normal ou do hospedeiro murino não foram infiltrados por CIK *in vivo*.

Secreção de HeLa Luciferase de Hsp47 em SCID/hu

Modelo Vivo de Imagiologia de Depuração de Tumores por CIK

Fêmeas balbc/SCID com 6 semanas de idade foram irradiados com 500 Rads no dia anterior à injeção intraperitoneal de 2×10^4 células HeLa_{luciferase} de carcinoma cervical capazes de luminescência *in vivo* passível de detecção por imagiologia. O grupo de tratamento com CIK foi injectado com CIK a uma relação efector/alvo (E:A) de 20:1 (1×10^6 células) através de injeção numa veia da cauda aquando do ensaio de provocação de células HeLa. Estas células HeLa_{luciferase} foram transitoriamente transformadas 24 horas antes da injeção através de protocolo de lipofectamina (GIBCO/BRL, NI) com um vector expressando de forma constituinte huHsp47 de comprimento integral dirigido para a secreção sob controlo antecipado imediato de

promoção de CMV ou respectivos vectores irrelevantes de controlo. A eficiência da transfecção foi vigiada através de co-transfecção de eGFP e da cópia transcrita de Hsp47 com análise subsequente por microscopia com laser de fluorescência de camadas simples HeLa_{luc} transformadas com um microscópio de fluorescência Axiophot (Zeiss, Jena, Alemanha) descrito anteriormente. Os animais injectados foram vigiados nos dias 0, 2 e 7 em relação a quimioluminescência *in vivo* de HeLa_{luciferase} após o ensaio de provocação de células CIK com um processo de imagiologia digital quantitativa em colaboração com o Dr. C. Contag (ver a Figura 13). Os animais que receberam a injeção de linfócitos CIK demonstraram uma diminuição drástica na massa de tumor viva e emissora de luz uma semana após a depuração pelos linfócitos CIK. Os animais que não receberam as células CIK demonstraram um desenvolvimento IP alargado de células HeLa. As células CIK demonstraram um elevado e rápido potencial de depuração de tumores sólidos.

Modelo GvHD Murino

Ratinhos macho Balb/c foram irradiados por duas vezes com 500 Rads antes do transplante. Células estaminais derivadas da medula óssea (MO) e do baço foram obtidas de ratinhos B10D2 (base H-2^d). 2,5x10⁶ células de MO e 1x10⁶ células de baço foram agrupadas como uma origem de enxerto para cada animal macho Balb/c receptor. Esta população não enriquecida de EC foi suspensa em RPMI contendo 300 µg de proteína Gst de Hsp47 em 300 µl de volume total ou em tampão contendo apenas 100 µg de proteína Gst de controlo. As células e a proteína foram administradas numa única injeção no dia 0. Não

foram administrados quaisquer outros tratamentos de imunossupressão. Os animais foram vigiados durante 4 semanas após o transplante de medula óssea. Todos os 5 animais que receberam o tratamento de proteína Gst de Hsp ficaram protegidos desde o início contra GvHD, afecções do pêlo, perda de peso e morte. Os animais que receberam apenas a proteína Gst apresentaram todos sinais de GvHD, afecções do pêlo e perda de peso, e 4 dos 5 animais morreram (ver Figura 15).

Exemplo 10

Análise FACS

Este Exemplo revela a utilização de Hsp47 modificado para identificar e separar subconjuntos de células imunes.

Várias células imunes respondem ao Hsp47 e não atacam células endoteliais. De modo a identificar tais células e a enriquecer as populações imunoterapêuticas destas células não reactivas a células endoteliais na presença de Hsp47, é possível utilizar Hsp47 marcado por fluorescência num aparelho comum de triagem de células para identificar e separar tais células. Esta utilização pode também servir como uma ferramenta de diagnóstico para a análise de subconjuntos de células imunes em vários estados de doença.

Uma sonda FACS de Hsp47 marcada com eGFP foi produzida através de engenharia genética complementar (Figura 8A). Isto permitiu a procura de potenciais receptores de huHsp47 e subconjuntos de CIK

expressando tais proteínas de ligação ao Hsp47. A análise FACS de linfócitos CIK d₂₁ maduros com huHsp47 marcado com eGFP como sonda FACS para o canal FITC, com co-coloração CE56-PE, baseia-se nas diferenças na capacidade de ligação de Hsp47 dos CIK analisados. A sonda Hsp47 marcada com eGFP coloriu um quarto dos CIK maduros (26%).

A descrição anterior pormenoriza métodos específicos que podem ser empregues para praticar a presente invenção. Tendo pormenorizado tais métodos específicos, os especialistas na técnica saberão suficientemente bem como conceber métodos fiáveis alternativos para chegar às mesmas informações ao utilizar os frutos da presente invenção. Portanto, independentemente do nível de pormenorização do anterior no texto, não deve ser interpretado como limitando o seu âmbito global; em vez disso, o âmbito da presente invenção deve apenas ser determinado pela interpretação legítima das reivindicações inclusas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR
UNIVERSITY

<120> "COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PROTEGER ÓRGÃOS, TECIDOS E
CÉLULAS DE DANOS MEDIADOS PELO SISTEMA IMUNITÁRIO"

<130> 12932-003W01

<140> PCT/US99/19337

<141> 1999-08-24

<150> Documento US 09/382088

<151> 1999-08-24

<150> Documento US 60/097640

<151> 1998-08-24

<160> 29

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sequência de consenso

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa = Val, Leu, Ala, ou Thr

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Leu ou His

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Ser ou Val

<221> VARIANTE

<222> 6

<223> Xaa = Asp ou Glu

<221> VARIANTE

<222> 7

<223> Xaa = Gln, Lys, ou Arg

<221> VARIANTE

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Leu ou Val

<400> 1

Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de consenso

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa = Val ou Ala

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Leu ou His

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Ser ou Val

<400> 2

Ala Xaa Xaa Xaa Ala Glu Gln Leu Arg
1 5

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg
1				5				

<210> 4
 <211> 1254
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

ctataactcg	tctcgcatct	tgtcaccctt	gagccggacc	aggcgcccaa	tgaatagcag	60
ggagccgctt	tgggtgtccc	gcaccaggaa	gatgaagggg	tggtcggcgt	agaacagctt	120
ggggctgcgc	agctcctcgc	gcccgtagat	gtcctggtoa	aaggggttgc	catctgtgtc	180
caactcaaag	gcggtggcgt	ggaacacact	ggccaggtag	agatccttct	tgccagacat	240
gcgtgataag	tcggccttgt	tcttgtcaat	ggcctcagtc	aggcccagcc	cagccaggtg	300
tttctgcagg	tcatgggtca	cctccaccac	acccttgggc	aaggagatgg	caacagcctt	360
cttctgcate	ttcccatcc	agatcttcag	ctgctctttg	gttagcagct	tttcaaggcg	420
ctcgagaggg	tccacgtgat	ggggcatgag	gatgatgagg	ctggagagct	tgtgagccag	480
gggcatctcc	accagctgca	gcttctcctt	ctcgtcgtcg	tagtagttgt	agaggcctgt	540
ccggtgcatc	atcgtaacac	ccacagtata	ggaccgagtc	accatgaagc	cacggttgtc	600
caccatcttg	tgggtggaatt	tctcatccca	gtgtggcttg	aagaacatgg	cgttgactag	660
cagggcgccg	tccgtgctct	ccacgtcctt	ggtgacctcg	ggcagcttgc	cgctcgggtgt	720
ctgcgcg'g'cc	cactcgttga	tggactgcag	cgcgctgcgc	ttgtccggga	agttgatctt	780
ggagtgtctg	cagttgtagt	gctgcttgct	gctcgccacg	aagtcatcag	cgaagctcac	840
tgagctgggt	ccgtacagtc	ggctgcccag	cttccaggtc	acgttgccgc	ccgtcgagtt	900
gctgagttag	cgcagcagct	cacccaggcc	ggcgtgcacc	tcctcgtcgc	gcagctgtct	960
ggcgtcagc	actgccttgg	cctgcgacgc	cgtggtcgcc	ttgccgcca	gcgacacgag	1020
accagcgac	gaggccacca	ccacgggtga	caccaggatg	ttctccactg	cctggtcctt	1080
ggccattgcc	tgatacaggc	tgaaggccag	gcctgtgctg	ggctctgcc	gtgtggctcgc	1140
cttggaaact	agcttctccg	cagtaccagg	ggctgcggcc	tctacaggtt	tcttcacctc	1200
ggctgccagg	gccacagcca	ggaggcataa	ggtgccca	aggagagagc	gcat	1254

<210> 5

<211> 1254

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1251)

<400> 5

```
atg cgc tct ctc ctt ctg ggc acc tta tgc ctc ctg gct gtg gcc ctg      48
Met Arg Ser Leu Leu Leu Gly Thr Leu Cys Leu Leu Ala Val Ala Leu
  1             5             10             15

gca gcc gag gtg aag aaa cct gta gag gcc gca gcc cct ggt act gcg      96
Ala Ala Glu Val Lys Lys Pro Val Glu Ala Ala Ala Pro Gly Thr Ala
             20             25             30

gag aag ctg agt tcc aag gcg acc aca ctg gca gag ccc agc aca ggc      144
Glu Lys Leu Ser Ser Lys Ala Thr Thr Leu Ala Glu Pro Ser Thr Gly
             35             40             45

ctg gcc ttc agc ctg tat cag gca atg gcc aag gac cag gca gtg gag      192
Leu Ala Phe Ser Leu Tyr Gln Ala Met Ala Lys Asp Gln Ala Val Glu
             50             55             60

aac atc ctg gtg tca ccc gtg gtg gtg gcc tcg tcg ctg ggt ctc gtg      240
Asn Ile Leu Val Ser Pro Val Val Val Ala Ser Ser Leu Gly Leu Val
             65             70             75

tcg ctg ggc ggc aag gcg acc acg gcg tcg cag gcc aag gca gtg ctg      288
Ser Leu Gly Gly Lys Ala Thr Thr Ala Ser Gln Ala Lys Ala Val Leu
             85             90             95

agc gcc gag cag ctg cgc gac gag gag gtg cac gcc ggc ctg ggt gag      336
Ser Ala Glu Gln Leu Arg Asp Glu Glu Val His Ala Gly Leu Gly Glu
             100             105             110

ctg ctg cgc tca ctc agc aac tcg acg gcg cgc aac gtg acc tgg aag      384
Leu Leu Arg Ser Leu Ser Asn Ser Thr Ala Arg Asn Val Thr Trp Lys
             115             120             125
```

ctg ggc agc cga ctg tac gga ccc agc tca gtg agc ttc gct gat gac	432
Leu Gly Ser Arg Leu Tyr Gly Pro Ser Ser Val Ser Phe Ala Asp Asp	
130 135 140	
ttc gtg gcg agc agc aag cag cac tac aac tgc gag cac tcc aag atc	480
Phe Val Ala Ser Ser Lys Gln His Tyr Asn Cys Glu His Ser Lys Ile	
145 150 155 160	
aac ttc ccg gac aag cgc agc gcg ctg cag tcc atc aac gag tgg gcc	528
Asn Phe Pro Asp Lys Arg Ser Ala Leu Gln Ser Ile Asn Glu Trp Ala	
165 170 175	
gcg cag acc acc gac ggc aag ctg ccc gag gtc acc aag gac gtg gag	576
Ala Gln Thr Thr Asp Gly Lys Leu Pro Glu Val Thr Lys Asp Val Glu	
180 185 190	
agc acg gac ggc gcc ctg cta gtc aac gcc atg ttc ttc aag cca cac	624
Ser Thr Asp Gly Ala Leu Leu Val Asn Ala Met Phe Phe Lys Pro His	
195 200 205	
tgg gat gag aaa ttc cac cac aag atg gtg gac aac cgt ggc ttc atg	672
Trp Asp Glu Lys Phe His His Lys Met Val Asp Asn Arg Gly Phe Met	
210 215 220	
gtg act cgg tcc tat act gtg ggt gtt acg atg atg cac cgg aca ggc	720
Val Thr Arg Ser Tyr Thr Val Gly Val Thr Met Met His Arg Thr Gly	
225 230 235 240	
ctc tac aac tac tac gac gac gag aag gag aag ctg cag ctg gtg gag	768
Leu Tyr Asn Tyr Tyr Asp Asp Glu Lys Glu Lys Leu Gln Leu Val Glu	
245 250 255	
atg ccc ctg gct cac aag ctc tcc agc ctc atc atc ctc atg ccc cat	816
Met Pro Leu Ala His Lys Leu Ser Ser Leu Ile Ile Leu Met Pro His	
260 265 270	
cac gtg gag cct ctc gag cgc ctt gaa aag ctg cta acc aaa gag cag	864
His Val Glu Pro Leu Glu Arg Leu Glu Lys Leu Leu Thr Lys Glu Gln	
275 280 285	
ctg aag atc tgg atg ggg aag atg cag aag aag gct gtt gcc atc tcc	912
Leu Lys Ile Trp Met Gly Lys Met Gln Lys Lys Ala Val Ala Ile Ser	
290 295 300	
ttg ccc aag ggt gtg gtg gag gtg acc cat gac ctg cag aaa cac ctg	960
Leu Pro Lys Gly Val Val Glu Val Thr His Asp Leu Gln Lys His Leu	
305 310 315 320	

gct ggg ctg ggc ctg act gag gcc att gac aag aac aag gcc gac tta	1008
Ala Gly Leu Gly Leu Thr Glu Ala Ile Asp Lys Asn Lys Ala Asp Leu	
325 330 335	
tca cgc atg tct ggc aag aag gat ctg tac ctg gcc agt gtg ttc cac	1056
Ser Arg Met Ser Gly Lys Lys Asp Leu Tyr Leu Ala Ser Val Phe His	
340 345 350	
gcc acc gcc ttt gag ttg gac aca gat ggc aac ccc ttt gac cag gac	1104
Ala Thr Ala Phe Glu Leu Asp Thr Asp Gly Asn Pro Phe Asp Gln Asp	
355 360 365	
atc tac ggg cgc gag gag ctg cgc agc ccc aag ctg ttc tac gcc gac	1152
Ile Tyr Gly Arg Glu Glu Leu Arg Ser Pro Lys Leu Phe Tyr Ala Asp	
370 375 380	
cac ccc ttc atc ttc ctg gtg cgg gac acc caa agc ggc tcc ctg cta	1200
His Pro Phe Ile Phe Leu Val Arg Asp Thr Gln Ser Gly Ser Leu Leu	
385 390 395 400	
ttc att ggg cgc ctg gtc cgg ctc aag ggt gac aag atg cga gac gag	1248
Phe Ile Gly Arg Leu Val Arg Leu Lys Gly Asp Lys Met Arg Asp Glu	
405 410 415	
tta tag	1254

Leu

<210> 6

<211> 417

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
1			5						10					15	
Ala	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Pro	Gly	Thr	Ala
			20					25					30		
Glu	Lys	Leu	Ser	Ser	Lys	Ala	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Pro	Ser	Thr	Gly
		35					40					45			
Leu	Ala	Phe	Ser	Leu	Tyr	Gln	Ala	Met	Ala	Lys	Asp	Gln	Ala	Val	Glu
		50				55					60				
Asn	Ile	Leu	Val	Ser	Pro	Val	Val	Val	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly	Leu	Val
65					70					75					80
Ser	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Thr	Thr	Ala	Ser	Gln	Ala	Lys	Ala	Val	Leu
				85					90					95	
Ser	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg	Asp	Glu	Glu	Val	His	Ala	Gly	Leu	Gly	Glu
			100					105						110	
Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Ser	Asn	Ser	Thr	Ala	Arg	Asn	Val	Thr	Trp	Lys
		115					120					125			
Leu	Gly	Ser	Arg	Leu	Tyr	Gly	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Phe	Ala	Asp	Asp
		130				135					140				
Phe	Val	Ala	Ser	Ser	Lys	Gln	His	Tyr	Asn	Cys	Glu	His	Ser	Lys	Ile
145					150					155					160
Asn	Phe	Pro	Asp	Lys	Arg	Ser	Ala	Leu	Gln	Ser	Ile	Asn	Glu	Trp	Ala
				165					170					175	
Ala	Gln	Thr	Thr	Asp	Gly	Lys	Leu	Pro	Glu	Val	Thr	Lys	Asp	Val	Glu
			180					185					190		
Ser	Thr	Asp	Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ala	Met	Phe	Phe	Lys	Pro	His
		195					200					205			
Trp	Asp	Glu	Lys	Phe	His	His	Lys	Met	Val	Asp	Asn	Arg	Gly	Phe	Met
		210				215					220				
Val	Thr	Arg	Ser	Tyr	Thr	Val	Gly	Val	Thr	Met	Met	His	Arg	Thr	Gly
225					230					235					240
Leu	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Asp	Asp	Glu	Lys	Glu	Lys	Leu	Gln	Leu	Val	Glu
				245					250					255	
Met	Pro	Leu	Ala	His	Lys	Leu	Ser	Ser	Leu	Ile	Ile	Leu	Met	Pro	His
			260					265					270		
His	Val	Glu	Pro	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Thr	Lys	Glu	Gln
		275					280					285			
Leu	Lys	Ile	Trp	Met	Gly	Lys	Met	Gln	Lys	Lys	Ala	Val	Ala	Ile	Ser
		290				295					300				
Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Val	Glu	Val	Thr	His	Asp	Leu	Gln	Lys	His	Leu
305					310					315					320
Ala	Gly	Leu	Gly	Leu	Thr	Glu	Ala	Ile	Asp	Lys	Asn	Lys	Ala	Asp	Leu
				325					330					335	
Ser	Arg	Met	Ser	Gly	Lys	Lys	Asp	Leu	Tyr	Leu	Ala	Ser	Val	Phe	His
			340					345					350		

Ala Thr Ala Phe Glu Leu Asp Thr Asp Gly Asn Pro Phe Asp Gln Asp
355 360 365
Ile Tyr Gly Arg Glu Glu Leu Arg Ser Pro Lys Leu Phe Tyr Ala Asp
370 375 380
His Pro Phe Ile Phe Leu Val Arg Asn Thr Gln Ser Glv Ser Leu Leu
385 390 395 400
Phe Ile Gly Arg Leu Val Arg Leu Lys Gly Asp Lys Met Arg Asp Glu
405 410 415
Leu

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Péptido sinteticamente produzido

<400> 7

Ala	Ala	His	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Arg
1				5				

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 8

Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Glu	Lys	Leu	Arg
1				5				

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 9

Ala Val Leu Ser Ala Asp Lys Leu Asn
1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> *Felis catus*

<400> 11

Ala Thr Leu Ser Ala Glu Lys Val Arg
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 12

Ala Leu Leu Ser Ala Glu Lys Val Asn
1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sequência de consenso

<221> VARIANTE

<222> 6

<223> Xaa = Asp ou Glu

<221> VARIANTE

<222> 7

<223> Xaa = Lys ou Gln

<400> 13

Ala Val Leu Ser Ala Xaa Xaa Leu Arg
1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sequência de consenso

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa = Val, Leu ou Thr

<221> VARIANTE

<222> 7

<223> Xaa = Gln, Lys ou Arg

<221> VARIANTE

<222> 8

<223> Xaa = Leu ou Val

<400> 14

Ala Xaa Leu Ser Ala Glu Xaa Xaa Arg
1 5

<210> 15

<211> 21

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>
 <223> Iniciador para PCR

 <400> 15
 acgttttgat ccaggtgaag a 21

 <210> 16
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador para PCR

 <400> 16
 gtccttgcc at 12

 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial

 <220>
 <223> Iniciador para PCR

 <400> 17
 gcaatggcca aggaccaggc agtggag 27

<210> 18

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para PCR

<400> 18

atctgaattc ctataactcg tctcgca

27

<210> 19

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Lys Asp Glu Leu

1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Arg Asp Glu Leu

1

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Met	Arg	Ser	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Cys	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Arg	Val	Glu	Leu
1			

<210> 23
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador para PCR

<400> 23
cggaattctg gccgaggtga agaaacc 27

<210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador para PCR

<400> 24
agttcccact gttctacgac ctagggc 27

<210> 25
<211> 28
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Iniciador para PCR

<400> 25
aactcaacct gtgtctagac ctatgggc 28

<210> 26
<211> 27
<212> ADN
<213> Sequência artificial

<220>

<223> Iniciador para PCR

<400> 26

acgcgctgct cctccacgac ctagggc

27

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> sequência de consenso

<221> VARIANTE

<222> 2, 4

<223> Xaa = Val ou Ala

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Leu ou His

<400> 27

Ala Xaa Xaa Xaa Ala Glu Gln Leu Arg
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Sequência de consenso

<221> VARIANTE

<222> 2

<223> Xaa = Val, Leu, Ala ou Thr

<221> VARIANTE

<222> 3

<223> Xaa = Leu ou His

<221> VARIANTE

<222> 4

<223> Xaa = Ala ou Val

<221> VARIANTE

<222> 6

<223> Xaa = Asp ou Glu

<221> VARIANTE

<222> 7

<223> Xaa = Lys, Gln, ou Arg

<221> VARIANTE
<222> (8)...(8)
<223> Xaa = Leu ou Val

<400> 28

Ala Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sequência de consenso

<221> VARIANTE
<222> (1)...(9)
<223> Xaa = any amino acid

<400> 29

Ala Xaa Xaa Xaa Ala Glu Gln Leu Arg
1 5

Lisboa, 25 de Setembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica compreendendo o polipéptido HuHsp47.
2. Utilização de um polipéptido imunoprotector relacionado com HuHsp47 para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas com danos em células mediados pelo sistema imunitário.
3. Utilização de um polipéptido imunoprotector relacionado com huHsp47 de acordo com a reivindicação 2, em que tais danos mediados pelo sistema imunitário sejam causados por uma doença auto-imune, reacção de enxerto vs hospedeiro ou doença hospedeiro vs enxerto.
4. Polipéptido com actividade imunoprotectora seleccionado dos seguintes:
 - a) huHsp47;
 - b) a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 1;
 - c) uma sequência de aminoácidos com actividade imunoprotectora com, pelo menos, cerca de 70% de identidade de sequência de aminoácidos com a sequência de aminoácidos indicada em a) ou b);
 - d) uma sequência de aminoácidos com actividade imunoprotectora codificada por um ácido nucleico que hibridiza para um ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos indicada em a) ou b)

- e) um fragmento de a) ou b), c) ou d) com actividade imunoprotectora;
 - f) uma variante de a), b), c) ou d) com actividade imunoprotectora.
5. Ácido nucleico isolado que codificando um polipéptido com actividade imunoprotectora seleccionado do grupo consistindo de:
- a) um ácido nucleico que codifica o huHsp47;
 - b) a sequência de ácidos nucleicos apresentada na Fig. 1;
 - c) uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um polipéptido com actividade imunoprotectora com, pelo menos, cerca de 70% de identidade de sequência de ácidos nucleicos com a sequência de ácidos nucleicos indicada em a);
 - d) uma sequência de ácidos nucleicos com actividade imunoprotectora que se hibridiza para um ácido nucleico que codifica a sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 1;
 - e) um fragmento de a), b), c) ou d) que codifica um polipéptido com actividade imunoprotectora;
 - f) uma variante de a), b), c) ou d) que codifica um polipéptido com actividade imunoprotectora.
6. Vector compreendendo um ácido nucleico codificando o polipéptido Hsp47 humano operavelmente ligado a sequências de

controlo reconhecidas por uma célula hospedeira transformada com o vector.

7. Célula hospedeira compreendendo o vector da reivindicação 6.
8. Método para reduzir os danos mediados pelo sistema imunitário em tecidos, órgãos ou células, compreendendo colocar em contacto os tecidos, órgãos ou células com um polipéptido imunoprotector relacionado com HuHsp47, em que tal método é *in vitro* ou *ex vivo*.
9. Utilização de um polipéptido de acordo com a reivindicação 4 ou de um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5 para a preparação de uma composição farmacêutica para a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas com danos em células mediados pelo sistema imunitário.
10. Utilização de um polipéptido ou ácido nucleico de acordo com a Reivindicação 9, em que tais danos mediados pelo sistema imunitário sejam causados por uma doença autoimunitária, doença enxerto vs hospedeiro ou doença hospedeiro vs enxerto.
11. Utilização de um polipéptido de acordo com a reivindicação 4 ou de um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5 para a preparação de uma composição para uma imunoterapia adoptiva para o tratamento de cancro, onde tal composição se destina a ser introduzida num doente em combinação com linfócitos T obtidos através de cultura de linfócitos T, de um dador sob

condições em que subconjuntos específicos de tais linfócitos T sejam expandidos.

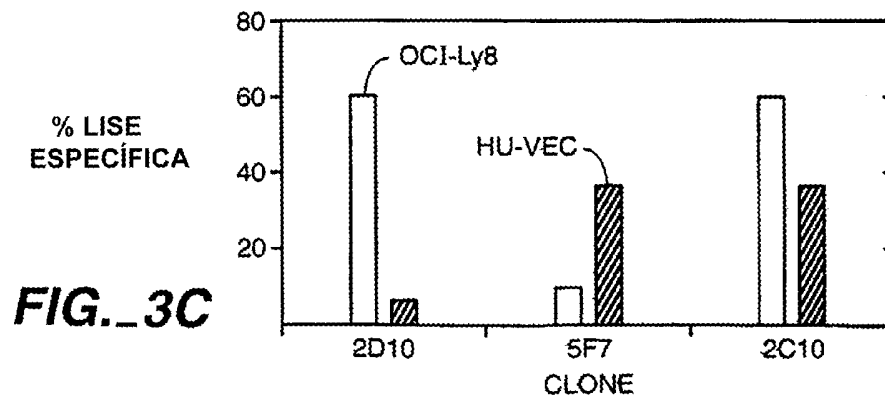
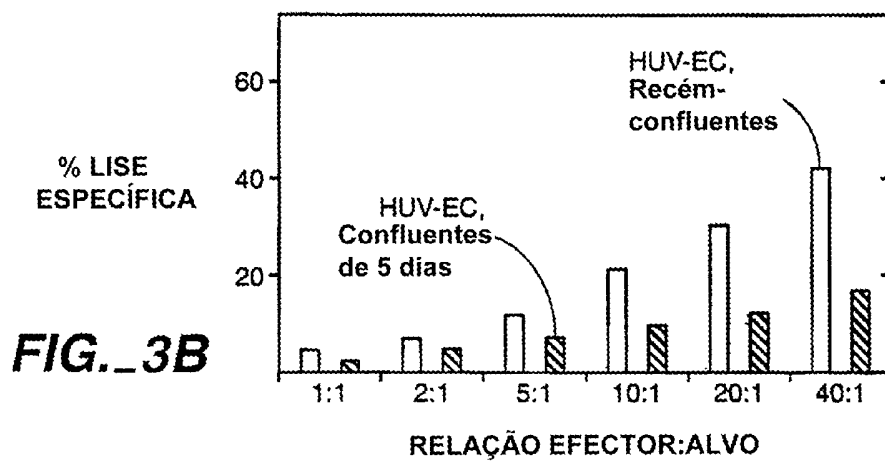
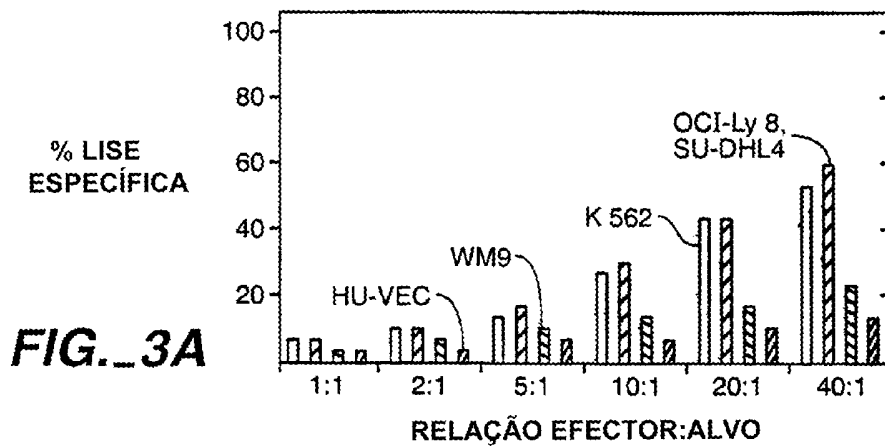
12. Método para a redução de danos mediados pelo sistema imunitário causados em tecidos, órgãos ou células compreendendo colocar em contacto tais tecidos, órgãos ou células com um ácido nucleico expressível codificando um polipéptido de acordo com a reivindicação 4 ou com um ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5, em que tal método é *in vitro* ou *ex vivo*.
13. Polipéptido imunoprotector relacionado com HuHsp47 como definido em qualquer uma das reivindicações anteriores em combinação com uma célula, tecido ou órgão.

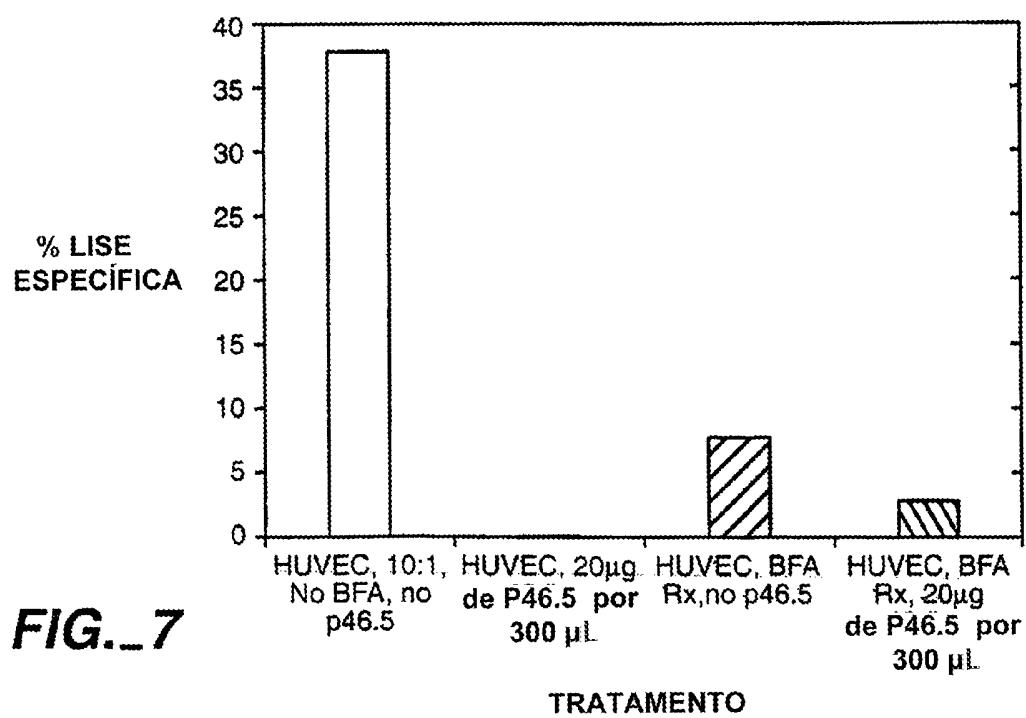
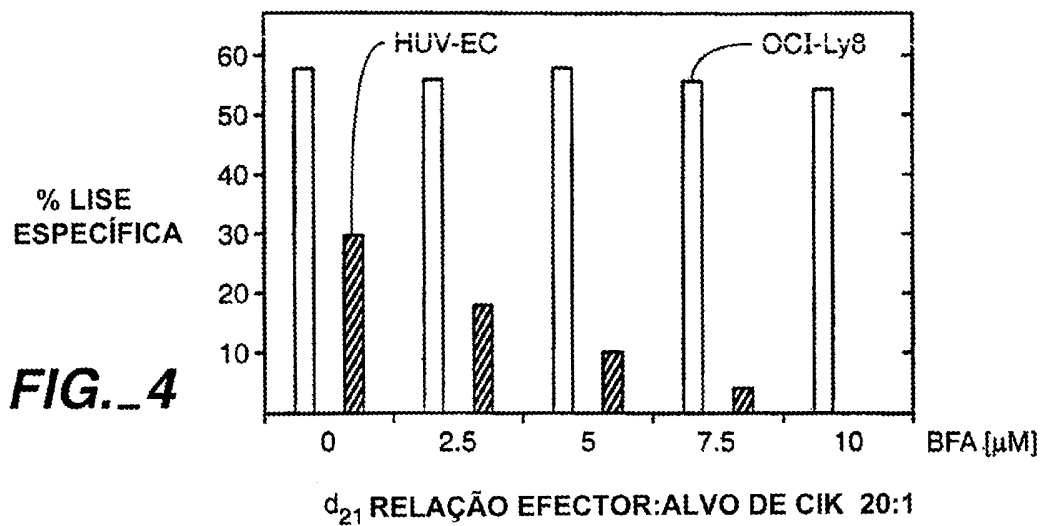
Lisboa, 25 de Setembro de 2008

Alinhamento de HSP47 com cadeias β de HLA/IL-12

<u>Molécula</u>	<u>Posição</u>	<u>Sequência de aminoácidos</u>	<u>Posição</u>
Humano Hsp47	96	AvlsAEQLR	104
Coligina Hu 2	95	AVLSAEQLR	103
HLA-A2 A*0201	149	AahvAEQLR	157
HLA-A2 A*0204	167	AahvAEQLR	175
HLA-A2 A*0206	175	AahvAEQLR	183
HLA-A2 A*0211	166	AahvAEQLR	174
HLA-A10 alpha	84	AahvAEQLR	92
HLA-Aw 69	150	AahvAEQLR	158
Ratazana Hsp47	94	AVLSAEkLR	102
Rato Hsp47	94	AVLSAEkLR	102
Hamster Hsp47	94	AVLSAEkLR	102
Galinha Hsp47	82	AVLSAdkLn	90
Cadeia β de IL-12 Hu	150	AtLSAErvR	158
Cadeia β de IL-12 de rato	150	AtLSAErvR	158
Cadeia β de IL-12 de gato	150	AtLSAEkvR	158
Cadeia β de IL-12 de vaca	150	AILSAEkvn	158
Consenso HSP		AVLSA(d,e)(k,q)LR	
Consenso HLA		A(v,a)(l,h)(a,v)AEQLR	
Consenso IL-12 β -chain		A(v,l,t)LSAE(q,k,r)(l,v)R	
Consenso global		A(v,l,a,t)(l,h)(a,v)A(d,e)(k,q,r)(l,v)R	

FIG. 2





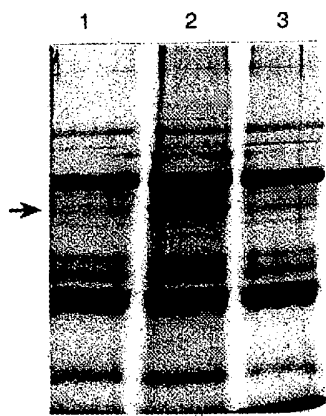


FIG._5A

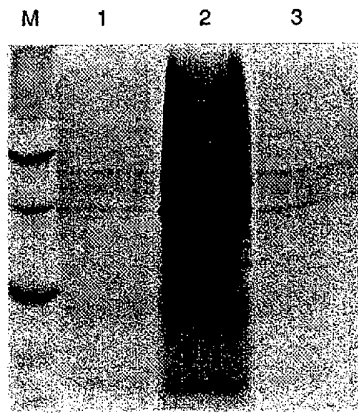


FIG._5B

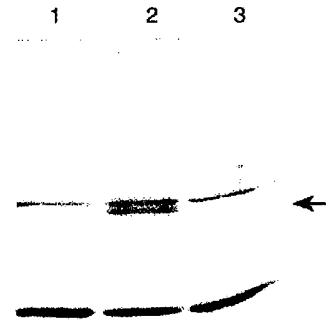


FIG._5C

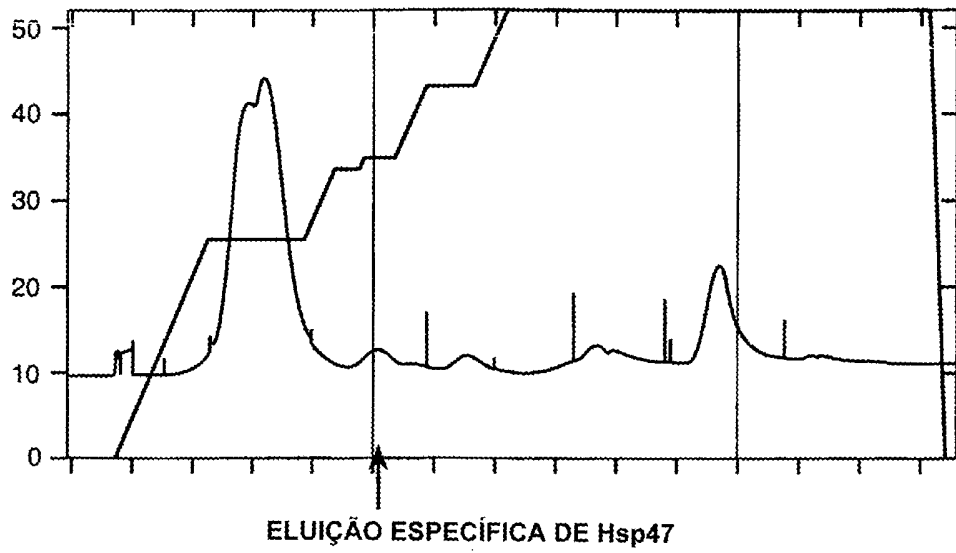


FIG._6A

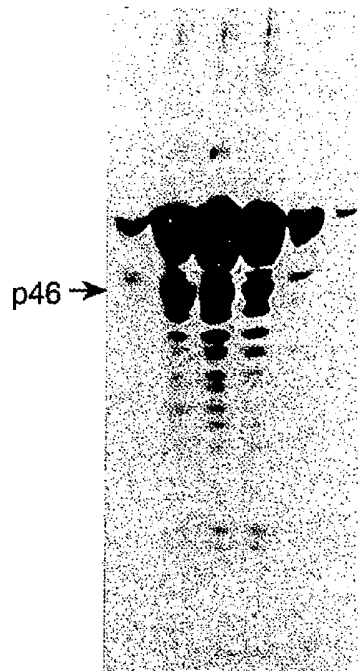


FIG._6B

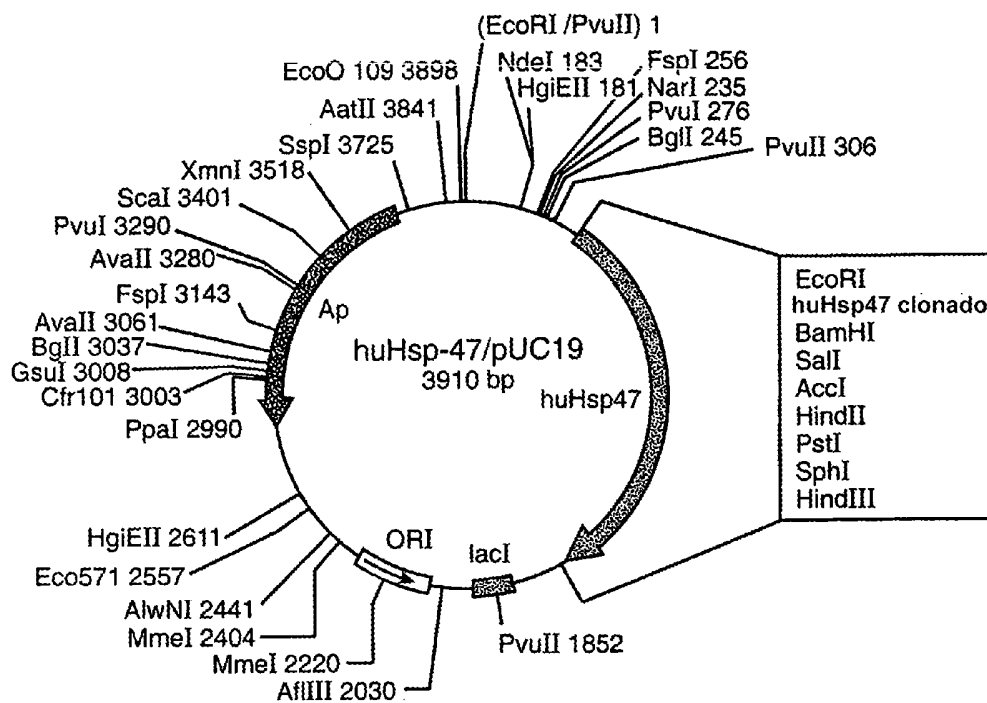
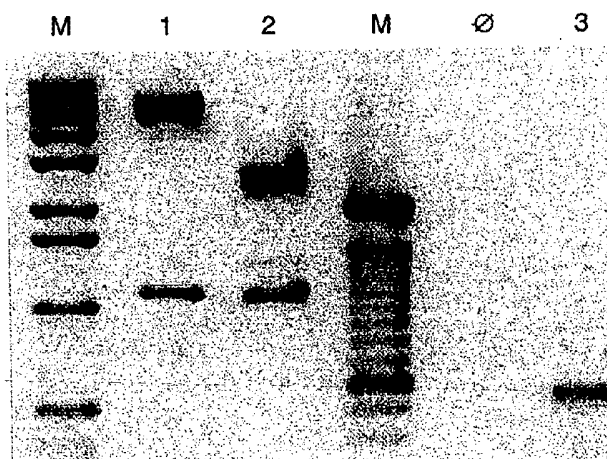


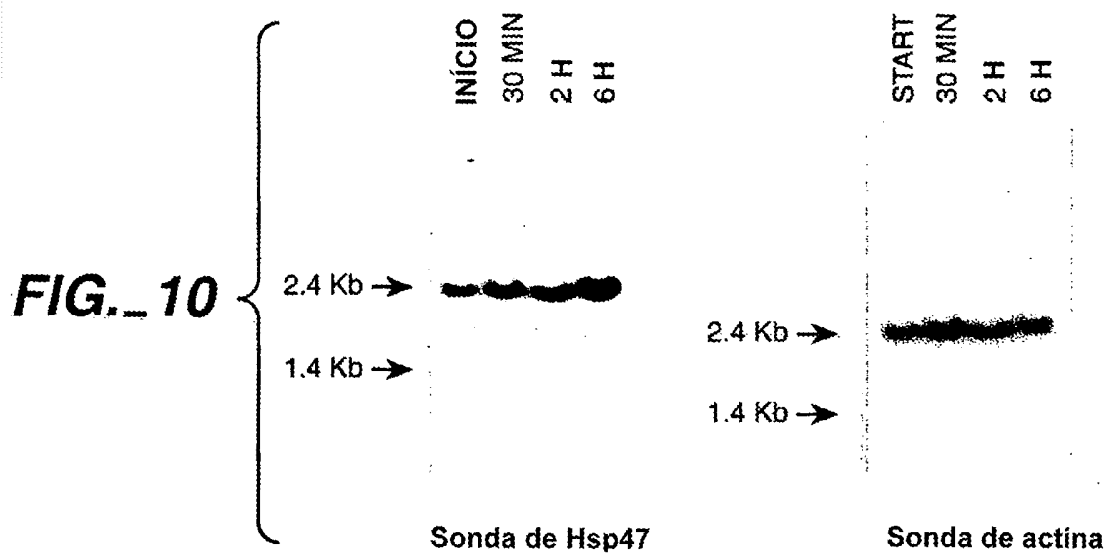
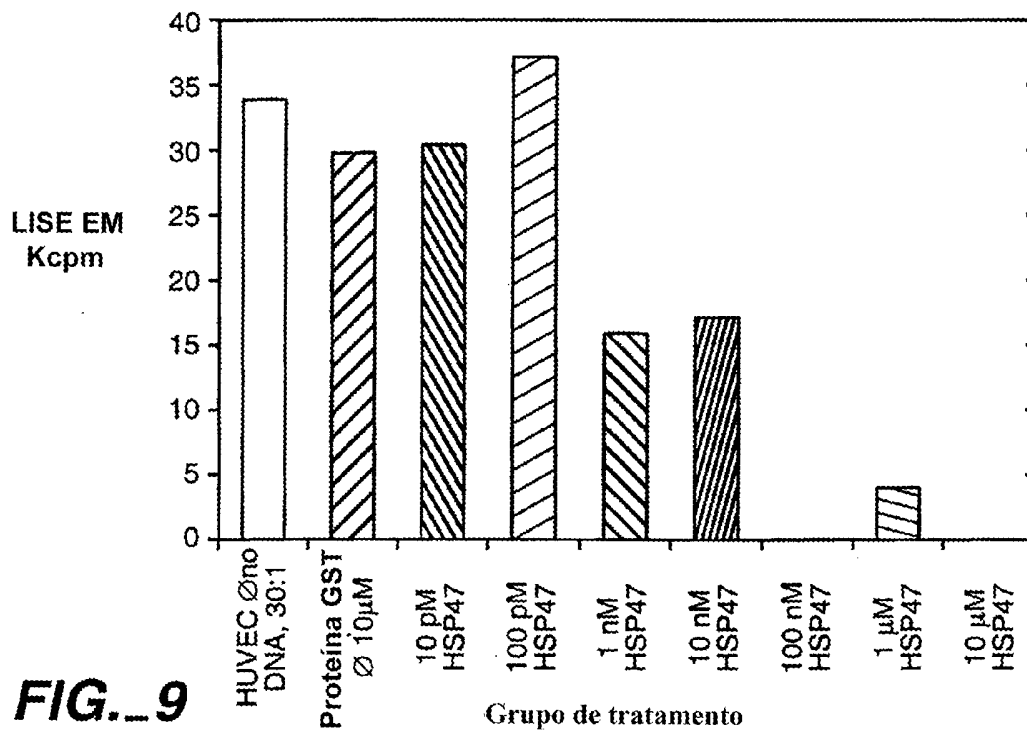
FIG. 8A



Nome do plasmídeo: huHsp47/pUC19
 Tamanho do plasmídeo: 3910 pb
 Cópia transcrita por: Ernest G. Hope
 Data da cópia transcrita: 1996

Comentários/referências: Cassete genética de huHsp47 baseada em Puc 19 derivada de 2 clones parciais em pCR1000/pGEM através de iniciadores (A. 5' -ACGTTTGGATCCAGGTGAAGA, 3' -GTCCTTGGCCAT B. 5' GCAATGGCCAAGGACCAGGCAGTGGAG, 3' ATCTGAATTCCATATAACTCGTCTCGCA)

FIG. 8B



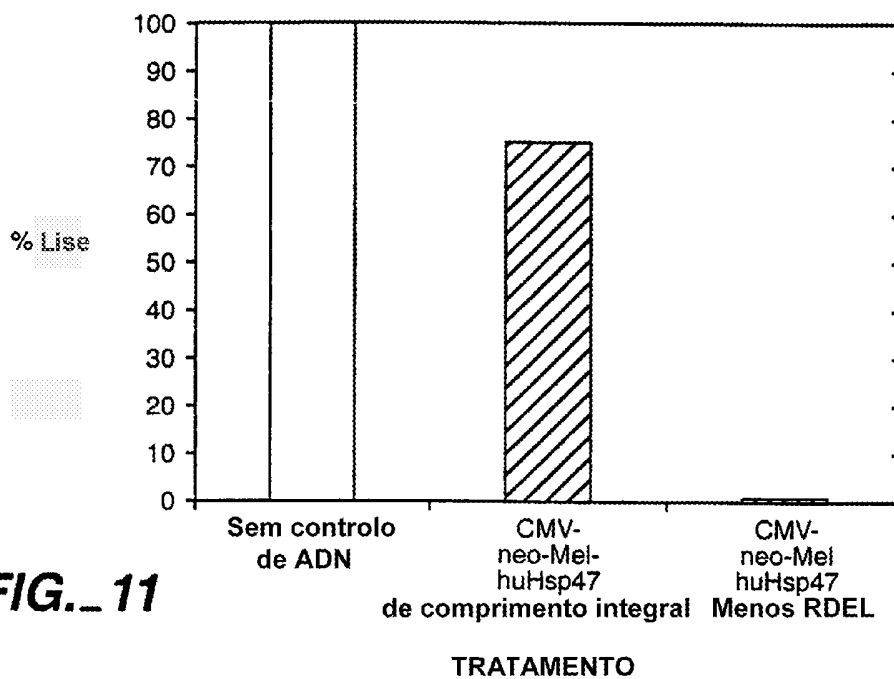


FIG. 11

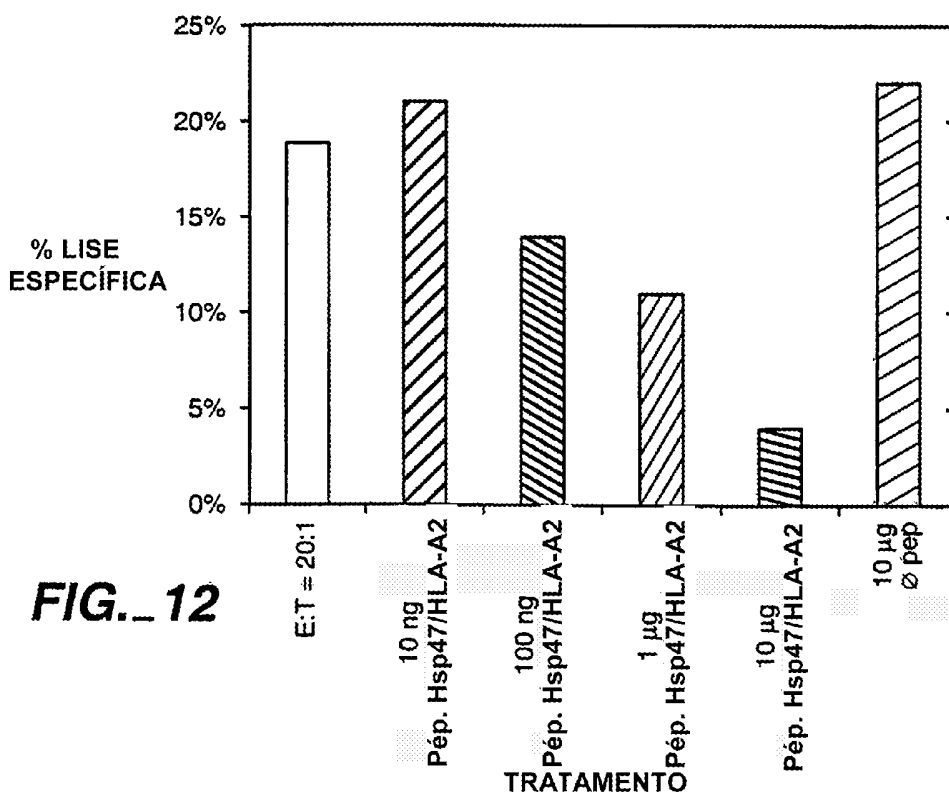


FIG. 12

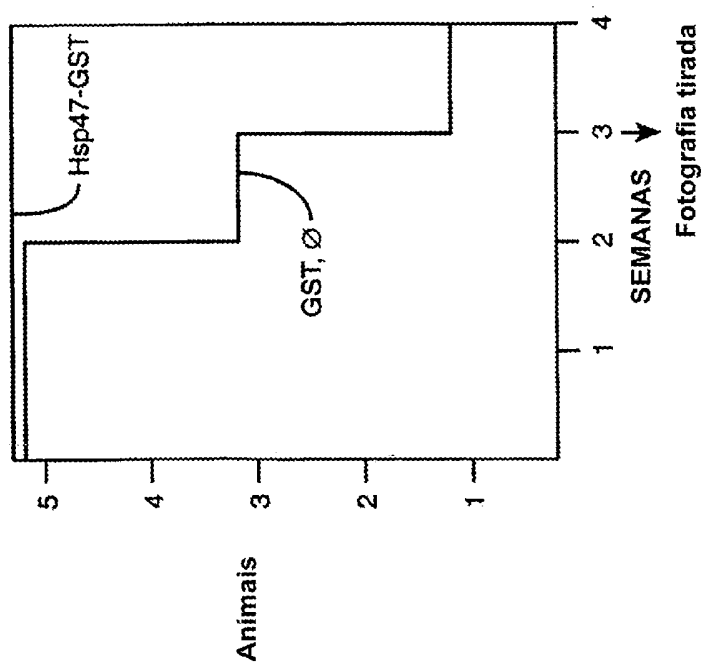
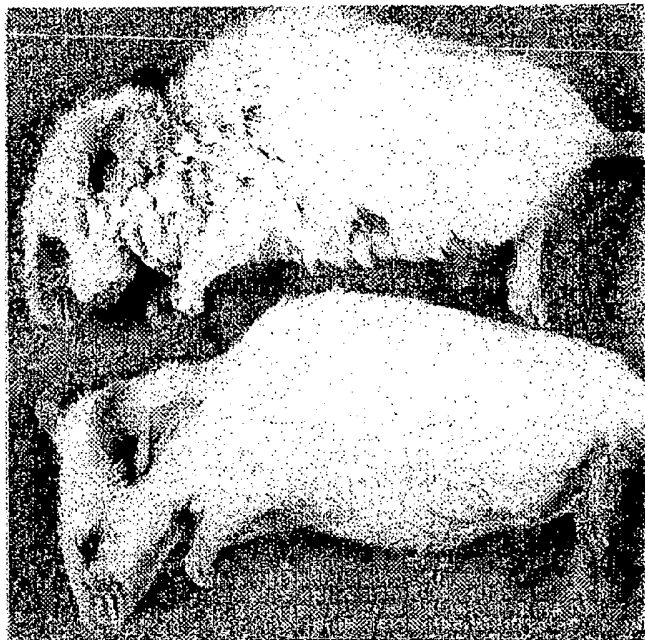


FIG._13

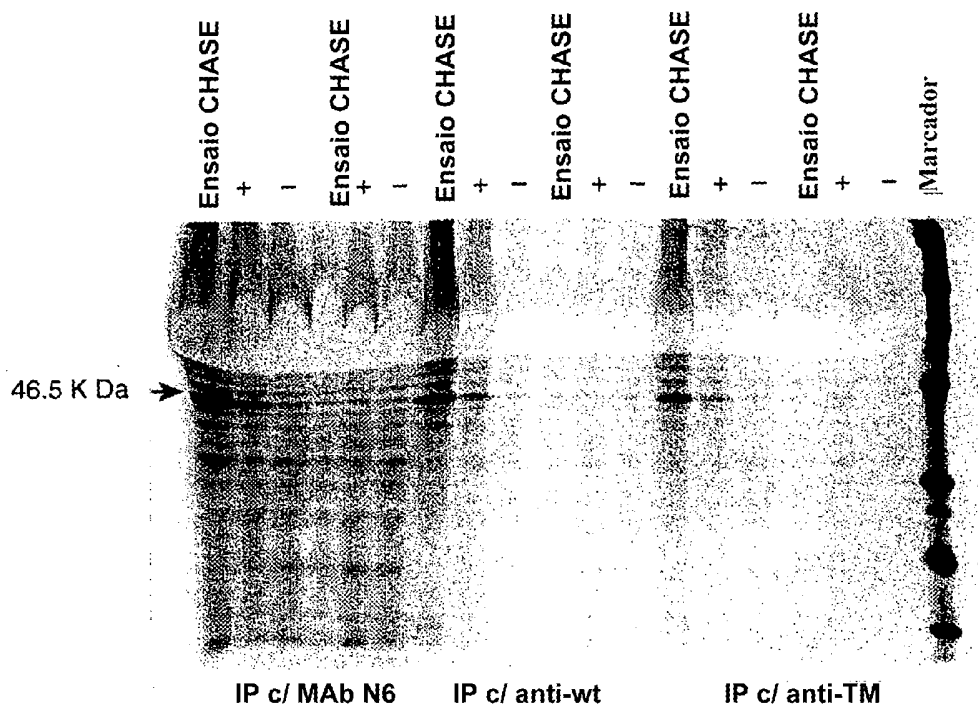
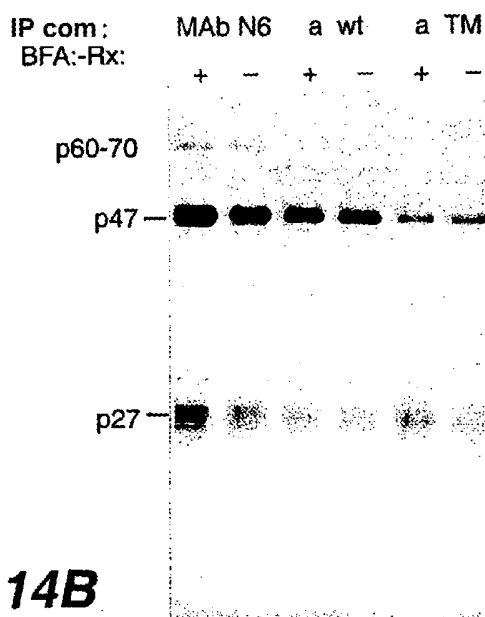


FIG._14A



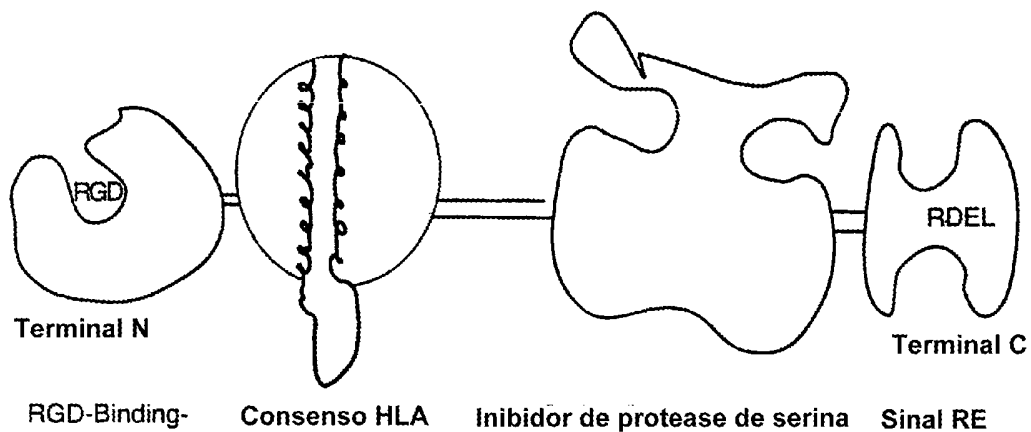


FIG._ 15A

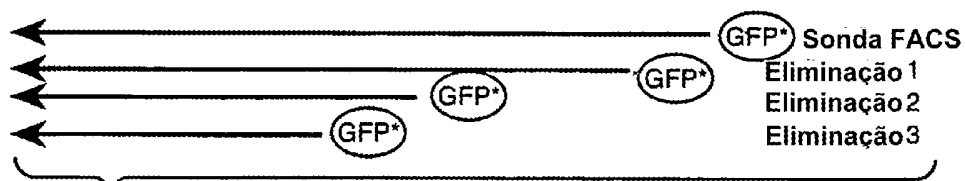


FIG._ 15B

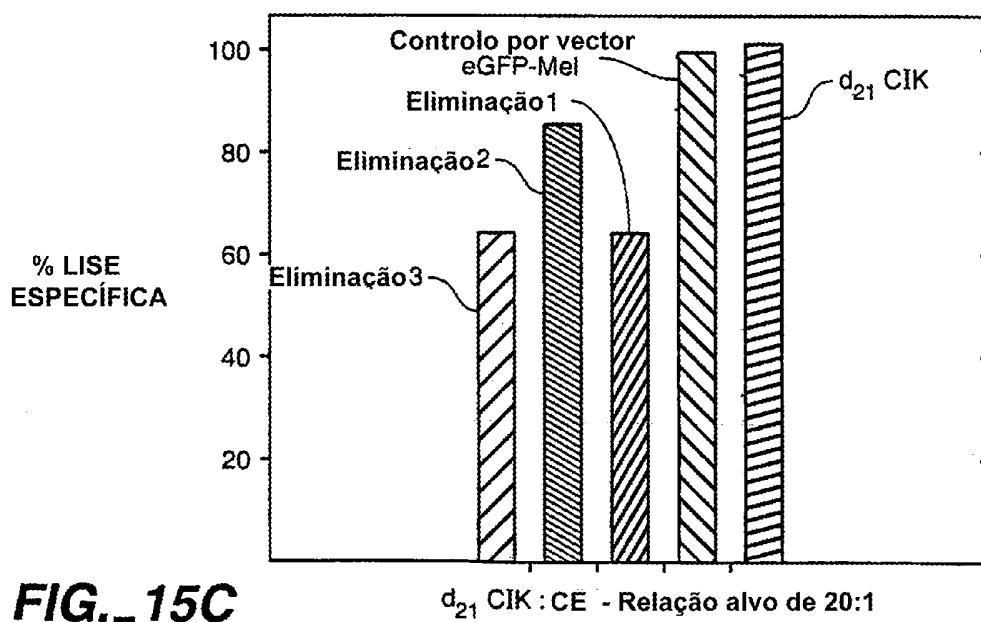


FIG._ 15C